



HAL
open science

Immunopathologie et approche thérapeutique dans la Trypanosomose Africaine

Frédéric-Antoine Dauchy

► **To cite this version:**

Frédéric-Antoine Dauchy. Immunopathologie et approche thérapeutique dans la Trypanosomose Africaine. Immunologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0390 . tel-02013380

HAL Id: tel-02013380

<https://theses.hal.science/tel-02013380>

Submitted on 11 Feb 2019

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

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

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Thèse

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bordeaux

Spécialité : Microbiologie - Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Frédéric-Antoine Dauchy

le 15 décembre 2016

**Immunopathologie et approche thérapeutique
dans la trypanosomose africaine**

Jury

Monsieur le Dr Frédéric BRINGAUD, Président

Monsieur le Dr Philippe BASTIN, Rapporteur

Monsieur le Pr Philippe LOISEAU, Rapporteur

Monsieur le Dr Derrick R. ROBINSON, Tuteur

Monsieur le Pr Philippe VINCENDEAU, Directeur

« Il faut bien attendre que le sucre fonde. »

Henri Bergson

Remerciements

Ces travaux ont été réalisés au sein du laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux - UMR IRD CIRAD INTERTRYP 177, et du laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, Université de Bordeaux - CNRS UMR 5234.

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté de juger cette thèse :

Monsieur le Docteur Frédéric BRINGAUD,
Monsieur le Docteur Philippe BASTIN,
Monsieur le Professeur Philippe LOISEAU,
Monsieur le Docteur Derrick R. ROBINSON,
Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé et soutenu au cours de ce travail :

Michel Dupon
Derrick Robinson
Mélanie Bonhivers
Denis Malvy
Pierrette Courtois
Sylvie Daulouède
Romaric Nzoumbou-Boko
Patricia Nabos
Denis Dacheux
Nicolas Landrein
Doranda Perdomo
Anne Cayrel
Anna Albisetti
Florian Lauruol
Thierry Noel
Loïc Rivière
Sylvie Lawson-Ayayi
Céline Gounou
Cécile Bordes
Vincent Pitard
Maria Mamani-Matsuda
Jérôme Rambert
Djavad Mossalayi

Je remercie enfin :

L'équipe soignante avec laquelle je travaille au quotidien (Hervé, Sabrina, Cédric, Anne-Laure, Nadine, Gaëtane, Fatima, Elisabeth, Aurore).
Mes proches, Grey et Marie-Cécile, Audrey, Mathilde.

Publications

- *Trypanosoma brucei* CYP51: essentiality and targeting therapy in an experimental model. Frédéric-Antoine Dauchy, Mélanie Bonhivers, Nicolas Landrein, Denis Dacheux, Pierrette Courtois, Florian Lauruol, Sylvie Daulouède, Philippe Vincendeau, Derrick R. Robinson. PLoS neglected tropical diseases 2016; 17: e0005125.
- *Trypanosoma brucei gambiense* secretome impairs lipopolysaccharide-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Frédéric-Antoine Dauchy, Cécile Bordes, Silla Semballa, Mélanie Bonhivers, Derrick R. Robinson, Jérôme Rambert, Pierrette Courtois, Sylvie Daulouède, Jean-Loup Lemesre, Philippe Vincendeau. Travail en cours.
- *Trypanosoma musculi* infection in mice critically relies on mannose receptor-mediated arginase induction by a *TbKHC1* homolog. Romaric Nzoumbou-Boko, Géraldine De Muylder, Silla Semballa, Laurence Lecordier, Frédéric-Antoine Dauchy, Alain P. Gobert, Philippe Holzmuller, Jean-Loup Lemesre, Rachel Bras-Gonçalves, Sylvie Daulouède, Pierrette Courtois, Pierrick Uzureau, Alain Beschin, Etienne Pays, Philippe Vincendeau. Article soumis pour publication.

Communications scientifiques

- *Trypanosoma brucei gambiense* induces incomplete maturation of human dendritic cells. Frédéric-Antoine Dauchy, Pierrette Courtois, Sylvie Daulouède, Philippe Vincendeau. 15^e Journée scientifique de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (avril 2015). Poster.
- *Trypanosoma brucei* CYP51: essentiality and targeting therapy in an experimental model. Frédéric-Antoine Dauchy, Mélanie Bonhivers, Nicolas Landrein, Denis Dacheux, Pierrette Courtois, Florian Lauruol, Sylvie Daulouède, Derrick R. Robinson, Philippe Vincendeau. 16^e Journée scientifique de l'école doctorale Sciences de la Vie et de la Santé (avril 2016). Poster.
- A *Trypanosoma* kinesin promotes parasite growth by triggering host arginase activity. Romaric Nzoumbou-Boko, Géraldine De Muylder, Laurence Lecordier, Frédéric-Antoine Dauchy, Philippe Holzmuller, Jean-Loup Lemesre, Rachel Bras-Gonçalves, Sylvie Daulouède, Pierrette Courtois, Alain Beschin, Etienne Pays, Philippe Vincendeau. 2nd ParaFrap Parasitology Conference (octobre 2016). Poster (en Annexe).

Autres publications

Bouquemont J, Lawson-Ayayi S, Rigotherier C, Bonnet F, Proust-Lima C, Neau D, Greib C, Miremont-Salamé G, Dabis F, Dupon M, **Dauchy FA**. Absence of decline of kidney function in HIV-infected patients under routine clinical management. Soumis pour publication.

Blanc P, Dutronc H, Peuchant O, **Dauchy FA**, Cazanave C, Neau D, Wirth G, Pellegrin JL, Morlat P, Mercié P, Tunon-de-Lara JM, Doutre MS, Pélissier P, Dupon M. Nontuberculous mycobacterial infections in a French Hospital: a 12-year retrospective study. PLoS One 2016; 13: e0168290.

Wille H, **Dauchy FA**, Desclaux A, Dutronc H, Vareil MO, Dubois V, Vital JM, Dupon M. Efficacy of debridement, antibiotic therapy and implant retention within three months during postoperative instrumented spine infections. Infectious Diseases 2016; 31: 1-7

Peters L, Cozzi-Lepri A, Hepatitis C working group for the COHERE in EuroCoord. Is response to anti-HCV treatment predictive of mortality in HCV/HIV positive patients? AIDS 2016; 21. doi: 10.1097.

Foissac M, Lekaditi M, Louffi B, Ehrhart A, **Dauchy FA**. Spondylodiscitis and bacteremia due to *Staphylococcus hyicus* in an immunocompetent man. Germs 2016; 6: 1-5.

Dauchy FA, Dutertre A, Lawson-Ayayi S, de Clermont-Gallerande H, Fournier C, Zanotti-Fregonara P, Dutronc H, Vital JM, Dupon M, Fernandez P. Interest of [(18)F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography for the diagnosis of relapse in patients with spinal infection: a prospective study. Clin Microbiol Infect. 2016; 22: 438-43.

Duffau P, Wittkop L, Lazaro E, le Marec F, Cognet C, Blanco P, Moreau JF, **Dauchy FA**, Cazanave C, Vandenhende MA, Bonnet F, Thiebaut R, Pellegrin I; ANRS CO3 Aquitaine Cohort Study Group. Association of immune-activation and senescence markers with non-AIDS-defining comorbidities in HIV-suppressed patients. AIDS 2015; 23: 2099-108.

Dufouil C, Richert L, Thiébaut R, Bruyand M, Amieva H, **Dauchy FA**, Dartigues JF, Neau D, Morlat P, Dehail P, Dabis F, Bonnet F, Chêne G; ANRS CO3 Aquitaine Study Group. Diabetes and cognitive decline in a French cohort of patients infected with HIV-1. Neurology 2015; 85: 1065-73.

Marzolini C, Sabin C, Raffi F, Siccardi M, Mussini C, Launay O, Burger D, Roca B, Fehr J, Bonora S, Mocroft A, Obel N, **Dauchy FA**, Zangerle R, Gogos C, Gianotti N, Ammassari A, Torti C, Ghosh J, Chêne G, Grarup J, Battegay M; Efavirenz, Obesity Project Team on behalf of Collaboration of Observational HIV Epidemiological Research Europe (COHERE) in EuroCoord. Impact of body weight on virological and immunological responses to efavirenz-containing regimens in HIV-infected, treatment-naive adults. *AIDS* 2015; 29: 193-200.

Merlet A, Cazanave C, **Dauchy FA**, Dutronc H, Casoli V, Chauveaux D, De Barbeyrac B, Dupon M. Prognostic factors of calcaneal osteomyelitis. *Scand J Infect Dis.* 2014; 46: 555-60.

Richert L, Brault M, Mercié P, **Dauchy FA**, Bruyand M, Greib C, Dabis F, Bonnet F, Chêne G, Dehail P; Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA). Decline in locomotor functions over time in HIV-infected patients. *AIDS* 2014; 28: 1441-9.

Merlet A, **Dauchy FA**, Creux H, Dupon M. Breast ulceration in a teenager. *Infection* 2014; 42: 449-50.

Richert L, Brault M, Mercié P, **Dauchy FA**, Bruyand M, Greib C, Dabis F, Bonnet F, Chêne G, Dehail P; Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA). Handgrip strength is only weakly correlated with physical function in well-controlled HIV infection: ANRS CO3 Aquitaine Cohort. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2014; 65: e25-7.

Dutronc H, Gobet A, **Dauchy FA**, Klotz R, Cazanave C, Garcia G, Lafarie-Castet S, Fabre T, Dupon M. Stump infections after major lower-limb amputation: a 10-year retrospective study. *Med Mal Infect.* 2013; 43: 456-60.

Dauchy FA, Dutronc H, Lawson-Ayayi S, Wirth G, Hofmann P, de Barbeyrac B, Fabre T, Dupon M. Characteristics of prosthetic joint infections leading to bacteremia: a case-control study. *Scand J Infect Dis.* 2013; 45: 863-7.

Morlat P, Vivot A, Vandenhende MA, **Dauchy FA**, Asselineau J, Déti E, Gerard Y, Lazaro E, Duffau P, Neau D, Bonnet F, Chêne G; Groupe d'Epidémiologie Clinique du Sida en Aquitaine (Gecsa). Role of traditional risk factors and antiretroviral drugs in the incidence of chronic kidney disease, ANRS CO3 Aquitaine cohort, France, 2004-2012. *PLoS One.* 2013; 8: e66223.

Dauchy FA, Dutronc H, Cazanave C, Dupon M. IDSA guidelines for the diagnosis and management of prosthetic joint infection: what is the correct duration of antibiotic treatment? *Clin Infect Dis.* 2013; 57: 160-1.

Dauchy FA, Pointillart V, Malvy D. Vertebral echinococcosis leading to spinal cord compression. *Eur Spine J.* 2012; 22: 667-668.

Bonnet F, Amieva H, Marquant F, Bernard C, Bruyand M, **Dauchy FA**, Mercié P, Greib C, Richert L, Neau D, Catheline G, Dehail P, Dabis F, Morlat P, Dartigues JF, Chêne G. Cognitive disorders in HIV-infected patients: are they HIV-related? *AIDS* 2013; 27: 391-400.

Merlet A, **Dauchy FA**, Dupon M. Hyperprocalcitonemia due to mushroom poisoning. *Clin Infect Dis.* 2012; 54: 307-8.

Richert L, Dehail P, Mercié P, **Dauchy FA**, Bruyand M, Greib C, Dabis F, Bonnet F, Chêne G; Groupe d'Epidémiologie Clinique du SIDA en Aquitaine (GECSA). High frequency of poor locomotor performance in HIV-infected patients. *AIDS* 2011; 25: 797-805.

Dutronic H, **Dauchy FA**, Cazanave C, Rougie C, Lafarie-Castet S, Couprie B, Fabre T, Dupon M. Candida prosthetic infections: case series and literature review. *Scand J Infect Dis.* 2010; 42: 890-5.

Dauchy FA, Lawson-Ayayi S, de La Faille R, Bonnet F, Rigotherier C, Mehse N, Miremont-Salamé G, Cazanave C, Greib C, Dabis F, Dupon M. Increased risk of abnormal proximal renal tubular function with HIV infection and antiretroviral therapy. *Kidney Int.* 2011; 80: 302-9.

Dauchy FA, Dégrange S, Charron A, Dupon M, Bébéar C, Maugein J. Variable-Number Tandem-Repeat Markers for typing *Mycobacterium intracellulare* strains isolated in humans. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 93.

Cazanave C, **Dauchy FA**, Dupon M, Dutronic H, Fleury H. H1N1 flu: another possible diagnosis. *Med Mal Infect.* 2010 May; 40: 302.

Dutronic H., **Dauchy FA**, Dupon M. Tuberculose. *La revue du praticien.* 2009; 59: 405-413.

Dauchy FA, Dupon M, Dutronic H, de Barbeyrac B, Lawson-Ayayi S, Dubuisson V, Souillac V. Association between psoas abscess and prosthetic hip infection: a case-control study. *Acta orthopædica.* 2009; 80: 198-200.

Kuli B, de Barbeyrac B, **Dauchy FA**, Dutronic H, Bébéar C, Mégraud F, Dupon M. In vitro activities of daptomycin, tigecycline, linezolid and eight other antibiotics, alone and in combination, against 41 *Staphylococcus spp.* clinical isolates from bone and joint infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33: 491-3.

Dutronc H, Billhot M, Dupon M, Eghbali H, Donamaria C, **Dauchy FA**, Reiffers J. Management of 315 neutropenic febrile episodes in a cancer center. *Med Mal Infect.* 2008; 39: 388-93.

Rivière A., de Clermont H., Farid K., Guyot M., Jeandot R., **Dauchy FA.**, Allard M., Dupon M., Fernandez P. Intérêt de l'imagerie hybride TEP-TDM dans l'exploration des infections. *Médecine nucléaire.* 2008; 146-153.

Dauchy FA, Gruson D, Chêne G, Viot J, Bébéar C, Maugein J, Bézian MC, Dutronc H, Dupon M. Prognostic factors in adult community acquired bacterial meningitis : a 4-year retrospective study. *Eur J Clin Microbial Infect Dis.* 2007; 26: 743-6.

Dauchy FA, Laharie D, Neau D, Lifermann F, Dupon M, Malvy D, Distomatose à *Fasciola Hepatica* : étude rétrospective sur 23 ans au CHU de Bordeaux. *Presse Med.* 2007; 36 : 1545-9.

Dauchy FA, Etienne G, Deminière C, Combe C, Merville P, Longy-Boursier M. Lymphomes à manifestations initiales rénales : à propos de 4 observations. *Rev Med Interne* 2006; 27 : 909-915.

Ralandison S, Etienne G, Ghiringhelli C.B, Parrens M, Touboul D, **Dauchy FA**, Economu A, Mercie P, Longy-Boursier M. Exophtalmia revealing a mantle cell lymphoma. *Rev Med Interne.* 2006; 27: 719-22.

Dauchy FA, Vincendeau P, Lifermann F. Eight cases of fascioliasis: clinical and microbiological features. *Med Mal Infect.* 2006; 36: 42-6.

Dauchy FA, Devars D, Lifermann F. Cystite emphysémateuse révélatrice d'un diabète. *Ann Endocrinol* 2004; 65: 176-178.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ARNi : interférence à ARN

ARNm : ARN messenger

APC : Allophycocyanine

Apo : Apolipoprotéine

APOL-1 : Apolipoprotéine L-1

BCR : *B-cell receptor*

BDCA : *Blood dendritic cell antigen*

CATT : *Card Agglutination Test for human Trypanosomosis*

CD : *Cluster of Differentiation*

CDC : *Centers for Diseases Control*

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CpG : Cytosine-phosphate-Guanine

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

CYP51 : Cytochrome P450 famille 51 (enzyme stérol 14 α -déméthylase)

DAMPs : *Danger-associated molecular patterns*

DCs : *Dendritic Cells*

DC-SIGN : *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DEAE : Diéthylaminoéthyle cellulose

DFMO : Difluorométhylornithine

ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ESAG : *Expression site-associated gene*

ESP : *Excreted-secreted protein*

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

Foxp3 : *Forkhead box P3*

FSC : Taille relative (*forward scatter*)

Gfi-1 : *Growth factor independent 1*

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

HDL : *High Density Lipoprotein*

HPR : *Haptoglobin-related protein*

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN- γ : Interféron-gamma

Ig : Immunoglobuline

IL-12 : Interleukine-12

ICOS : *CD28-like receptor Inducible Costimulatory*

ICOS-L : *CD28-like receptor Inducible Costimulatory-Ligand*

iNOS : *Inducible nitric oxide synthase*

IRF : *Interferon Regulatory Factor*

LAMP : *Loop-mediated isothermal amplification*

LCR : Liquide céphalo-rachidien
LPS : Lipopolysaccharide
MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*
MDSCs : *Myeloid cell-derived suppressor cells*
MyD88 : *Myeloid differentiation primary response protein 88*
NECT : *Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy*
NF-κB : *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
NK : *Natural killer*
NKT : *Natural Killer T lymphocyte*
NO : *Nitric oxide*
NOD : *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*
OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*
OX40L : *OX40 Ligand*
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PAMPs : *Pathogen-associated molecular pattern*
PD1 : *Programmed cell Death 1*
PDL : *Programmed cell Death Ligand*
PE : *Phycoérythrine*
PI3K : *Phosphatidylinositol 3-kinase*
PRR : *Pattern Recognition Receptor*
RE : *Réticulum endoplasmique*
RORγt : *Retinoic acid-related orphan receptor γt*
Runx : *Runt-related transcription factor*
SIGN-R3 : *Specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin receptor 3*
SRA : *Serum Resistance Associated protein*
SR-A : *Type A Scavenger Receptor*
SSC : *Granularité relative, (side scatter)*
STAT : *Signal Transduction and Activator Transcription*
TbHpHbR : *T. brucei surface receptor for haptoglobin-haemoglobin*
TCR : *T-cell receptor*
Tfh : *Follicular helper T cell*
TGF-β : *Transforming Growth Factor-beta*
TGsGP : *T. b. gambiense-specific glycoprotein*
THA : *Trypanosomose Humaine Africaine*
TLTF : *Trypanosome Lymphocyte-Triggering Factor*
TLF : *Trypanosome Lytic Factor*
TLR : *Toll Like Receptor*
TNF-α : *Tumor Necrosis Factor-alpha*
Treg : *Lymphocyte T régulateur*
VSG : *Variant Surface Glycoprotein*

Table des matières

1	Introduction	1
2	Revue bibliographique	5
2.1	La trypanosomose humaine africaine.....	5
2.1.1	Classifications	5
2.1.2	Organisation cellulaire	7
2.1.3	Division cellulaire	12
2.1.4	Cycle parasitaire	14
2.1.5	Présentation clinique	15
2.1.6	Traitement de l'infection.....	16
2.2	La biosynthèse des stéroïdes, cible thérapeutique dans la THA.....	20
2.2.1	Les stéroïdes	20
2.2.2	Biosynthèse des stéroïdes chez les <i>Trypanosomatidae</i>	21
2.2.3	CYP51	24
2.2.4	Rôle essentiel de CYP51 chez certains <i>Trypanosomatidae</i>	28
2.2.5	Médicaments interférant avec la biosynthèse des stéroïdes.....	30
2.3	Immunopathologie de la THA.....	36
2.3.1	Introduction	36
2.3.2	Rappels immunologiques.....	37
2.3.2.1	Lignées hématopoïétiques	37
2.3.2.2	Les cellules dendritiques (DCs).....	39
2.3.3	Immunopathologie	50
2.3.3.1	Résistance des trypanosomes au sérum humain.....	50
2.3.3.2	Modulation de la fonction des cellules présentatrices d'antigènes	52
2.3.3.3	Modification de la balance iNOS/arginase.....	58
2.3.3.4	Echappement par la VSG.....	61
3	Travaux de recherche	64
	Article 1	65
	Article 2.....	90
	Article 3.....	107
4	Discussion générale.....	145
5	Bibliographie	151
	Annexe	176

Introduction

1 Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une infection provoquée par un parasite eucaryote unicellaire du genre *Trypanosoma*. Le parasite est transmis à l'homme par la piqûre d'une mouche hématophage du genre *Glossina*, la mouche tsé-tsé. La THA dite ouest-africaine est la plus fréquente. Elle est due à *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*) transmis par des glossines vivant dans un biotope végétal ombragé ou à proximité des cours d'eau en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. La THA est-africaine est, quant à elle, due à *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*) transmis par des glossines vivant dans les broussailles en Afrique de l'Est.

La THA est une maladie négligée à l'origine d'environ 10 000 à 20 000 nouveaux cas déclarés par an. Il s'agit probablement d'une sous-estimation, du fait de l'absence de prospection dans de nombreux foyers et dans les zones de combats. Environ 60 millions d'individus seraient exposés au risque, essentiellement en zone rurale (*WHO Expert Committee on human African trypanosomiasis* n°984, 2013)(Simarro *et al.* 2012)(Malvy *et al.* 2011). Dans la THA à *T.b. gambiense*, l'Homme est le réservoir principal des parasites. En revanche, dans la THA à *T.b. rhodesiense*, les animaux sauvages (notamment les antilopes et les cochons sauvages) sont les réservoirs naturels, et l'infection humaine est accidentelle. Les schémas de traitement dépendent du stade clinique et du parasite en cause. Ils reposent sur des médicaments parfois anciens et qui peuvent causer des effets indésirables. La guérison est finalement obtenue dans 80 à 90% des cas. Cependant, la moitié des décès sont imputables à une iatrogénie, notamment par encéphalopathie arsenicale. L'usage de la combinaison nifurtimox-éflornithine (*nifurtimox-eflornithine combination therapy, NECT*) a amélioré la prise en charge des patients en phase d'encéphalite (Priotto *et al.* 2009)(Alirol *et al.* 2013). Il existe également des sujets trypanotolérants, des sujets qui éliminent spontanément leurs parasites (Jamonneau *et al.* 2012)(Berthier *et al.* 2016). La recherche des mécanismes sous-jacents pourrait permettre la découverte de nouvelles stratégies d'interférence dans la THA. La recherche de

nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin d'améliorer l'efficacité et la tolérance des traitements dans la THA demeure nécessaire.

Les stérols sont des constituants indispensables des membranes chez les eucaryotes et sont également les précurseurs de molécules importantes. Un exemple est le rôle des hormones stéroïdes chez les mammifères. La voie de biosynthèse des stérols a été partiellement caractérisée chez les protozoaires. L'enzyme stérol 14 α -déméthylase (CYP51) joue un rôle clé dans cette voie de biosynthèse (de Souza *et al.* 2009)(Lepesheva *et al.* 2011). Récemment, le caractère essentiel de cette enzyme a été mis en évidence chez une autre espèce de *Trypanosomatidae* : *Leishmania donovani* (McCall *et al.* 2015). Cependant, les données demeurent limitées chez *T. brucei*. Contrairement aux autres *Trypanosomatidae*, les formes sanguines de *T. brucei* ont la particularité d'utiliser le cholestérol plasmatique de leur hôte pour construire leurs membranes (Coppens *et al.* 1988). Néanmoins, il a été montré que la voie de biosynthèse endogène des stérols reste active, y compris dans des conditions où le cholestérol est disponible en abondance (Zhou *et al.* 2007)(Nes *et al.* 2012). Les faibles quantités de dérivés de l'ergostérol produites par le parasite suggèrent que, au cours de son cycle chez le mammifère, *T. brucei* utilise les stérols endogènes pour un rôle métabolique ou de signalisation. Du fait de l'intérêt potentiel de CYP51 en tant que cible thérapeutique, nous avons étudié, dans un premier travail, le caractère essentiel de cette enzyme et l'effet de son inhibition dans un modèle expérimental murin.

La co-évolution de *T.b. gambiense* et *T.b. rhodesiense* avec leur hôte s'est accompagnée de l'élaboration de différents mécanismes d'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte. Le phénomène de variation antigénique, par renouvellement de la glycoprotéine de surface (variant surface glycoprotein, VSG), constitue un mécanisme d'échappement majeur du parasite à la réponse immunitaire de l'hôte (Black *et al.* 2010)(Pays *et al.* 2014). L'induction de la voie de l'arginase macrophagique est un autre mécanisme d'échappement (Gobert *et al.* 2000). L'induction de cette enzyme conduit à la fois à la biosynthèse de molécules nécessaires à la croissance du parasite et à l'inhibition de la production de molécules microbicides. Cette induction est médiée par une kinésine présente parmi les protéines excrétées/sécrétées (*excreted-secreted proteins*, ESPs ou sécrétome) par le parasite dans son environnement (De Muylder *et al.*

2013). Les protéines excrétées/sécrétées sont impliquées dans différents aspects de la physiopathogénie et de l'immunomodulation observée dans la THA (Okenu *et al.* 1999)(Lonsdale-Eccles *et al.* 2002)(Holzmuller *et al.* 2008)(Grébaut *et al.* 2009). La première étape de reconnaissance d'un agent pathogène implique les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), dont le rôle est crucial pour l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire innée et adaptative. La maturation des cellules dendritiques (*Dendritic Cells, DCs*) s'accompagne de l'augmentation d'expression de marqueurs de surface (Complexe majeur d'histocompatibilité, CD40, CD80, CD86) et de la production de cytokines qui induisent respectivement la prolifération des lymphocytes T naïfs et orientent la différenciation des lymphocytes T. (Banchereau *et al.* 1998)(Kapsenberg *et al.* 2003). Il a été montré que les DCs sont impliquées dans l'activation de la réponse lymphocytaire dirigée contre la VSG au cours de la THA (Dagenais *et al.* 2009). Cependant, il a été mis en évidence que le sécrétome de *T.b. gambiense* peut altérer la maturation de DCs murines stimulées par le lipopolysaccharide (LPS) (Garzon *et al.* 2013). De plus, il a également été montré que la VSG peut induire une maturation incomplète des DCs murines à l'origine d'une réponse lymphocytaire de type Th2 (production d'interleukine 4 et 10) par défaut (Pletinckx *et al.* 2011). En raison de l'intérêt du sécrétome de *T.b. gambiense* comme modèle d'étude et du rôle des DCs dans l'immunopathologie de la THA, nous avons étudié dans un deuxième travail l'effet de ce sécrétome sur les caractéristiques de DCs humaines.

Revue bibliographique

2 Revue bibliographique

2.1 La trypanosomose humaine africaine

2.1.1 Classifications

Les trypanosomes sont des protistes (eucaryotes unicellulaires) de type protozoaires, flagellés et extracellulaires. Très répandus dans la nature, ils parasitent de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux et mammifères. Sur le plan phylogénétique, les trypanosomes appartiennent à la famille des *Trypanosomatidae*, à la classe des *Kinetoplastea* (ou *Kinetoplastida*, kinétoplastidés), à l'embranchement des *Euglenozoa*, au sous-domaine des *Bikonta* et au domaine des *Eukaryota* (Lecointre & Le Guyader 2006).

Les trypanosomes (genre *Trypanosoma*) peuvent être classés en deux grandes catégories : les *Stercoraria* et les *Salivaria* (Figure 1) (Hoare *et al.* 1972)(Vickerman *et al.* 1985).

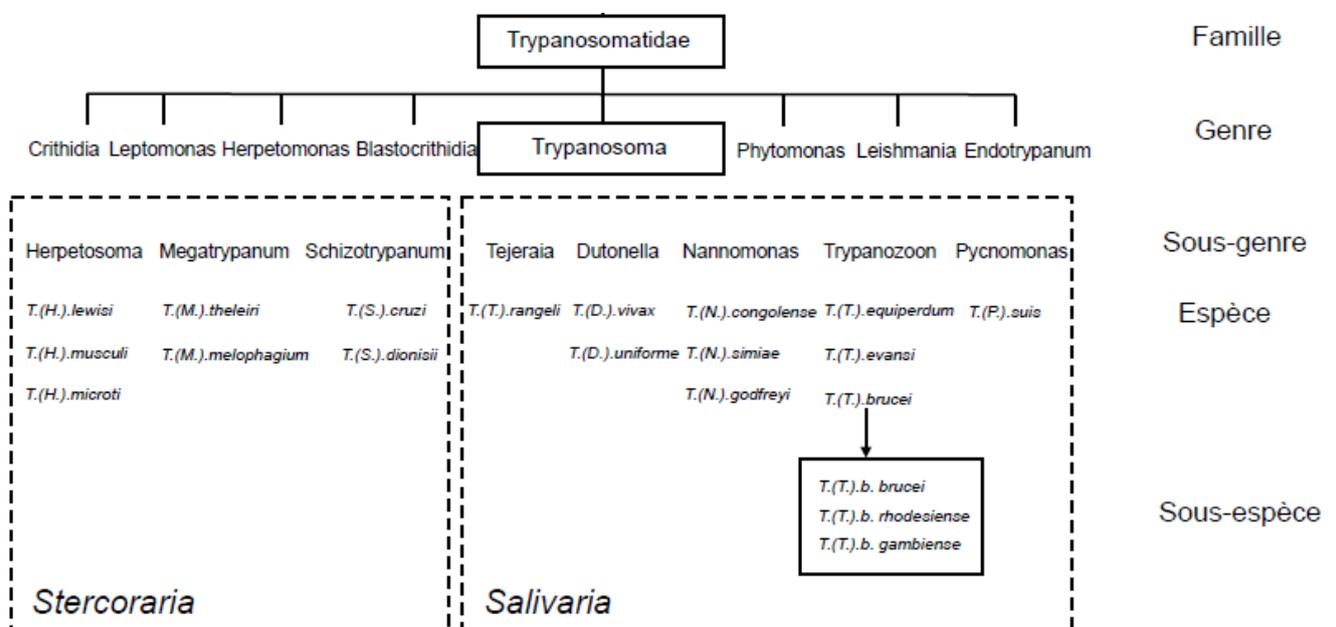


Figure 1 : Classification des trypanosomes (d'après Vickerman *et al.* 1985)

Les *Stercoraria* sont transmis par les déjections de leur vecteur. Le plus connu est *Trypanosoma cruzi*, agent de la trypanosomose américaine ou maladie

de Chagas, dont le vecteur est une punaise appartenant à la famille des *Reduviidae*. La transmission des *Salivaria* se fait par piqûre. L'exemple type est le complexe *brucei* qui comprend les trois espèces transmises par la mouche tsé-tsé : *Trypanosoma brucei brucei* (*T.b. brucei*), *Trypanosoma brucei gambiense* (*T.b. gambiense*) et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T.b. rhodesiense*). *T.b. gambiense* et *T.b. rhodesiense* sont responsables de la THA. La première identification d'un de ces agents pathogènes date de 1902 par Dutton et Forde, suite à une observation au microscope du sang d'un marin sujet à de nombreux épisodes fébriles. Ils le désignent sous le nom de *Trypanosoma gambiense* et décrivent ainsi la fièvre à trypanosomes de Gambie (Forde 1902 & Dutton 1902).

T.b. gambiense et *T.b. rhodesiense* ne sont pas différenciables par la microscopie classique. Ils ne peuvent également pas être distingués de *T.b. brucei*, lequel peut infecter de nombreux mammifères, mais pas l'Homme. En effet, *T.b. brucei* est sensible à l'activité cytotoxique innée du sérum humain normal (Hawking *et al.* 1973)(Hager *et al.* 1997). Différentes techniques ont été développées pour le typage des souches, les techniques de PCR étant les plus récentes (Hide *et al.* 1990)(Bromidge *et al.* 1993)(Barrett *et al.* 1997). L'identification de la sous-espèce *T.b. rhodesiense* peut être faite par amplification du gène codant pour la protéine SRA (*serum resistance-associated*) et celle de *T.b. gambiense* par amplification de TgsGP (*T. b. gambiense-specific glycoprotein*) (Radwanska *et al.* 2002)(Gibson *et al.* 2010). L'identification de *T.b. rhodesiense* par amplification isotherme de SRA par la technique LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*) a été proposée (Njiru *et al.* 2008)(Hayashida *et al.* 2015). Cette technique permet l'amplification d'acides nucléiques à température constante, avec un haut niveau de spécificité. *T.b. gambiense* est subdivisé en deux groupes en fonction de différents critères : la virulence observée expérimentalement chez le rongeur (les souches du groupe 2 sont davantage virulentes), des marqueurs biochimiques et génétiques ainsi que l'hétérogénéité de leur répertoire antigénique (les souches du groupe 2 présentent un répertoire davantage hétérogène) (Gibson *et al.* 1986)(Kanmogne *et al.* 1996). Une technique plus rapide pour différencier ces deux groupes par PCR a été proposée, basée sur l'étude du polymorphisme de séquences répétées (une séquence codante et cinq microsatellites) (Biteau *et al.* 2000)(Giroud *et al.* 2009).

2.1.2 Organisation cellulaire

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés fusiformes, mis en évidence chez l'Homme dans le sang, les ganglions, le liquide céphalo-rachidien, très mobiles à l'état frais. La coloration permet de visualiser un noyau central et le noyau de la mitochondrie (le kinétoplaste) situé à proximité de l'origine du flagelle. Leur taille varie de 15 à 30 μm de long et 1,5 à 3,5 μm de large. Le flagelle borde latéralement le corps cellulaire et se prolonge en avant du parasite (Figure 2).

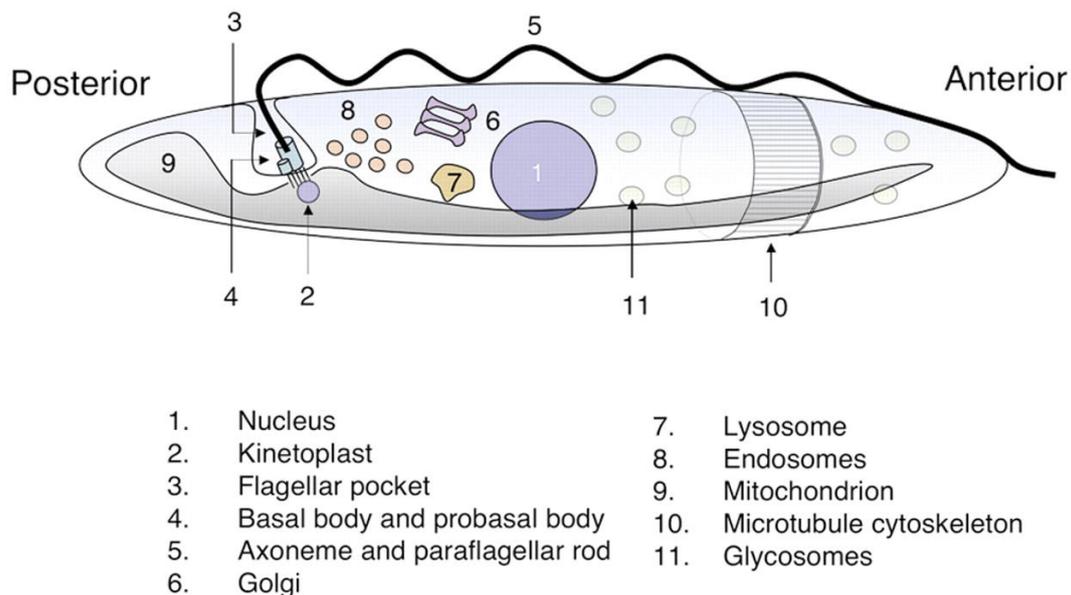


Figure 2 : Organisation cellulaire des Trypanosomes (Matthews *et al.* 2005)

Le périplasme

Le corps cellulaire est délimité par une paroi, le périplasme constitué de trois couches. La médiane, est la moins dense et correspond à une bicouche lipidique. L'interne, est un tapis de microtubules sub-pelliculaires et l'externe un ensemble de VSG constituant un manteau. Les microtubules sous-pelliculaires, au même titre que l'axonème flagellaire et le corps basal, constituent le cytosquelette du trypanosome. Ils sont composés de protéines tubulines α et β polymérisées en organelles cylindriques de 25 nm de diamètre. Le manteau de glycoprotéines de 15 nm d'épaisseur recouvre la totalité du trypanosome dans sa forme sanguine. Il

résulte de l'assemblage de dimères de VSG ancrées dans la membrane plasmique par des groupements glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Figure 3).

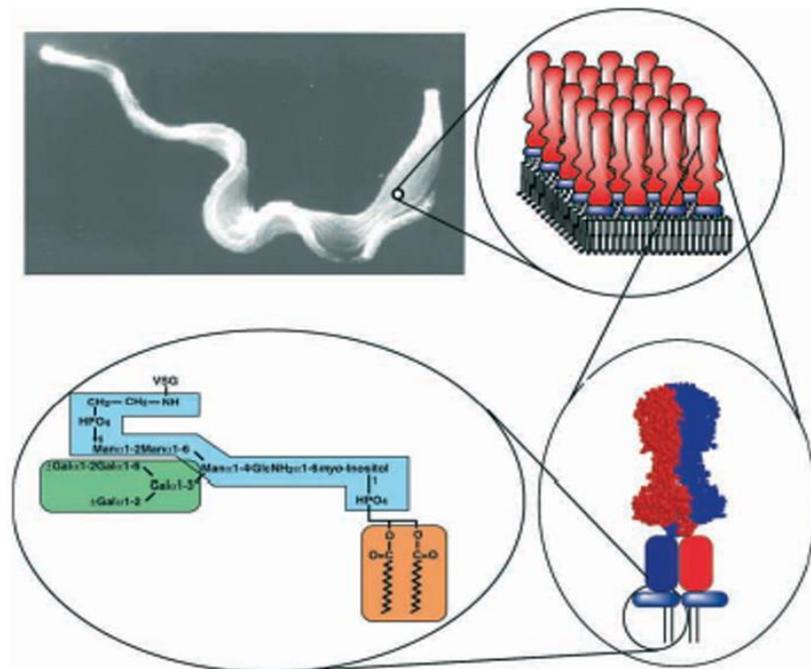


Figure 3 : Forme sanguine de *T. brucei* en microscopie électronique (en haut à gauche). Schéma d'une coupe de la membrane (en haut à droite) et de la structure d'un dimère de VSG (en bas à droite). La structure d'une ancre GPI est représentée (en bas à gauche) avec les motifs galactose en vert et les acides gras en orange. (<http://legacy.earlham.edu>).

Le flagelle et la poche flagellaire

Le flagelle est un organe plurifonctionnel nécessaire à la survie du parasite au sein des divers environnements qu'il rencontre lors de son cycle de développement. Le flagelle émerge de la poche flagellaire (petite invagination de la membrane plasmique), puis s'étend le long du corps cellulaire en formant la membrane ondulante (système complexe de fins filaments). Le flagelle se compose d'un axonème, de structure microtubulaire riche en dynéines, impliqué dans la mobilité ainsi que dans la croissance et la multiplication du parasite (Springer *et al.* 2011)(Blisnik *et al.* 2014). Il est initié à son point de fixation dans le cytoplasme, à partir d'un corps basal de structure centriolaire classique à 9 triplets, associé perpendiculairement à un centriole secondaire sans flagelle (Cachon *et al.* 1988). Outre son rôle moteur, le flagelle permet au parasite de s'attacher à l'épithélium des glandes salivaires de l'insecte. Il est également requis pour le bon positionnement

des organites, la morphogénèse et la division cellulaire. Le trypanosome est un modèle de choix pour l'étude du flagelle puisque sa structure de base est conservée. La poche flagellaire intervient d'une part dans la polarité cellulaire et la division cellulaire, et d'autre part, constitue le siège privilégié de l'activité d'endocytose / exocytose (Gull *et al.* 1999)(Field *et al.* 2009) (Figure 4). Récemment, la formation de vésicules extracellulaires et de nanotubes à partir de la membrane flagellaire a également été observée (Szempruch *et al.* 2016). Ces vésicules seraient impliquées dans le transport de facteurs de virulence et notamment dans le développement d'une anémie chez l'hôte (Szempruch *et al.* 2016).

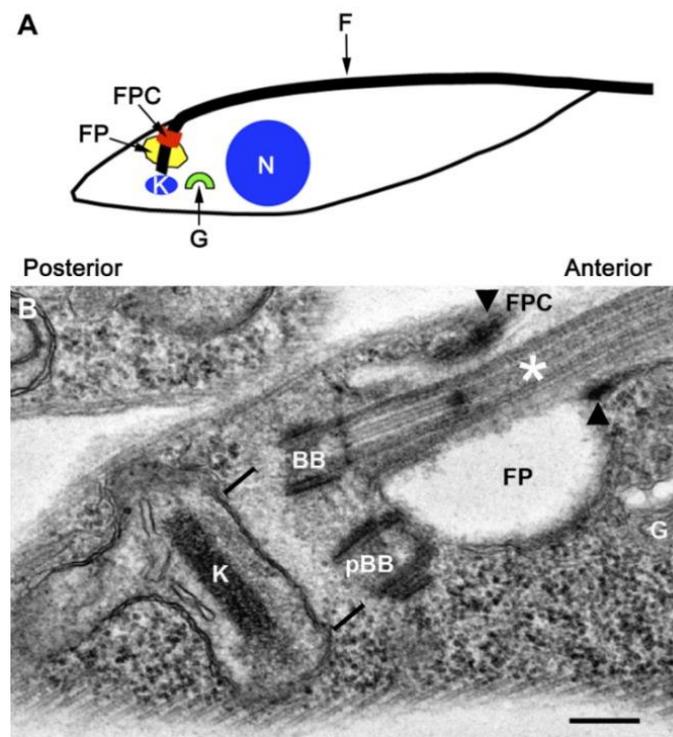


Figure 4 : (A) Schéma d'une forme procyclique de *T. brucei*, avec la localisation de la poche flagellaire (FP), du collet de la poche flagellaire (FPC), du kinétoplaste (K), de l'appareil de Golgi (G), du flagelle (F) et du noyau (N). (B) Image en coupe en microscopie électronique passant par la poche flagellaire d'une forme procyclique de *T. brucei*. L'astérisque correspond à l'axonème. Corps basal (BB) et corps pro-basal (pBB). (Bonhivers *et al.* 2008)(Perdomo *et al.* 2016).

Les organelles

En dehors du réticulum endoplasmique (RE) qui est réparti à travers le cytoplasme, les organelles de sécrétion et d'endocytose sont situés entre la poche flagellaire, le kinétoplaste et le noyau, à proximité duquel se trouve l'unique lysosome. L'appareil de Golgi présente une structure multivésiculaire à faces *cis*- et *trans*- et différencie les endosomes de triage et de recyclage. Chez les *Trypanosomatidae*, les principales étapes de la glycolyse sont réalisées dans un organite apparenté aux peroxyzomes : le glycosome (Bringaud *et al.* 2015). En plus des enzymes de la glycolyse, le glycosome contient également d'autres enzymes telle la glycosyltransférase, nécessaire à la synthèse des glycoprotéines (Mariño *et al.* 2010). L'unique mitochondrie, ramifiée dans tout le cytoplasme, contient l'ADN extrachromosomique à la base du flagelle dans une zone appelée kinétoplaste (noyau de la mitochondrie). Le kinétoplaste constitue le support génétique des adaptations métaboliques aux différents milieux dans lesquels le parasite évolue. Il est constitué de 2 types de molécules d'ADN circulaire : les maxi-cercles (au nombre de 10 à 30) et les mini-cercles (5000 à 10 000) entrelacés les uns dans les autres, constituant ainsi un réseau complexe et compact (Simpson *et al.* 1987). Une particularité est la maturation des ARNm mitochondriaux, qui se réalise par addition et délétion de résidus uridine, impliquant un mécanisme appelé édition des ARN.

Le noyau

Le noyau est entouré d'une double membrane perforée. Il renferme le karyosome ou nucléole et des granules de chromatine doublant la face interne de la membrane nucléaire. La position du noyau est variable en fonction du stade évolutif du parasite. Dans les formes sanguines, il est situé au centre ou dans la moitié antérieure. Le noyau de *T. brucei* contient le génome diploïde qui a été entièrement séquencé (Berriman *et al.* 2005) et compte environ 35 mégabases subdivisées en 11 chromosomes de 0,7 à 6 Mpb, 2 à 4 chromosomes intermédiaires de 300 à 900 kpb et 0 à 100 mini-chromosomes de 25 à 150 kpb, codant au total pour environ 10 000 gènes polycistroniques. La maturation des ARN pré-messagers nucléaires présente la particularité de se faire par trans-épissage, qui correspond à l'ajout d'une séquence leader.

Variations morphologiques

Les trypanosomes sont soumis à des contraintes environnementales fortes, car ils doivent obligatoirement se développer au sein de deux organismes : la mouche tsé-tsé et l'hôte mammifère. Les trypanosomes peuvent prendre plusieurs formes selon le stade de maturation et l'organisme qui les héberge. Dans le sang des mammifères, on les trouve sous la forme trypomastigote qui englobe les formes courtes ou « *stumpy* » infectantes pour la glossine et les formes longues ou « *slender* » de multiplication. Dans le tube digestif de l'insecte vecteur, le manteau protecteur est constitué de procycline, protéine qui les protège contre les enzymes digestives de l'insecte (Acosta-Serrano *et al.* 2001). Dans l'organisme hôte, le phénomène de variation antigénique, par renouvellement de la VSG constitue un mécanisme d'échappement majeur du parasite à la réponse immunitaire de l'hôte.

Les lipides

L'adaptation du trypanosome à son milieu environnemental induit une nouvelle distribution de ses composants lipidiques. L'homéostasie lipidique met en jeu une variété de facteurs régulant l'activité des enzymes responsables de leur synthèse *de novo*. Cette dernière s'effectue soit à partir de molécules précurseurs provenant de l'hôte, soit à partir du catabolisme de lipides endocytosés (Voorheis *et al.* 1980)(Smith *et al.* 2010). Les lipides représentent 11 à 18% du poids sec des trypanosomes et sont représentés par des phospholipides, des acides gras et des stérols. Les phospholipides (glycérophospholipides et sphingolipides) représentent environ 80% de ces lipides et comportent une forte proportion de phosphatidyléthanolamine et de phosphatidylsérine. La composition en phospholipides varie selon les formes du parasite. La biosynthèse du phosphatidylinositol se déroule dans le reticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Pour la biosynthèse des acides gras, les trypanosomes possèdent une voie de biosynthèse localisée dans la mitochondrie (*fatty acid synthase type II*) et une autre voie de biosynthèse, prédominante, localisée dans le réticulum endoplasmique (*fatty acid elongase system*) (Ramakrishnan *et al.* 2013). La composition en stérols varie fortement entre les formes sanguines et les formes procycliques. Le cholestérol constitue 95% des stérols présents dans les formes sanguines et provient de l'hôte par endocytose. Dans les formes procycliques, le

cholesta-5,7,24-triénol, le cholestérol et l'ergosta-5,7,25(27)-triénol représentent plus de 84% des stérols totaux (Smith *et al.* 2010). Chez les trypanosomes, les phospholipides et certains stérols participent à la formation de radeaux lipidiques (Denny *et al.* 2001), en particulier au niveau de la membrane du flagelle (Tyler *et al.* 2009)(Serricchio *et al.* 2015).

2.1.3 Division cellulaire

La réplication et la ségrégation des organelles pour produire deux cellules filles sont fortement contrôlées durant le cycle cellulaire. Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes comporte quatre phases : G1, S, G2 et M. Dans les cellules animales, la séparation cellulaire (cytodiérèse) débute avant que la ségrégation des chromosomes soit achevée lors de la mitose. La division cellulaire des trypanosomes suit ce modèle général mais présente des particularités (McKean *et al.* 2003)(Hammarton *et al.* 2007). Notamment, les chromosomes ne se condensent pas pendant la mitose. De plus, le corps basal, à la différence des cellules animales, ne joue pas de rôle dans l'organisation du fuseau mitotique mais est impliqué dans la division du kinétoplaste.

Les étapes successives de la division cellulaire sont proches chez les formes sanguines et chez les formes procycliques, avec une durée de cycle plus courte chez les formes sanguines (6 heures contre 8,5 heures). Le cycle débute par la maturation et la duplication du corps basal. Très rapidement, l'ADN du kinétoplaste se réplique et, pendant ce temps, un nouveau flagelle commence à se former à partir du nouveau corps basal mature qui est en position postérieure. Les corps basaux commencent à se séparer entraînant la ségrégation des kinétoplastes (Robinson *et al.* 1991). L'ADN nucléaire se réplique pendant que le nouveau flagelle s'allonge vers l'extrémité antérieure de la cellule. La mitose se déroule ensuite et le noyau le plus postérieur migre entre les deux kinétoplastes. La cytodiérèse débute à l'extrémité antérieure de la cellule et se poursuit vers l'extrémité postérieure pour générer deux cellules filles (Figure 5). Les duplications du noyau et du kinétoplaste sont coordonnées avec la croissance du nouveau flagelle. Les différentes étapes du cycle sont contrôlées par l'activation séquentielle de protéines régulatrices du cycle cellulaire telles des cyclines, des kinases dépendantes des cyclines, et des phosphatases, dont les rôles diffèrent souvent de leurs orthologues présents chez

la levure ou dans les systèmes mammifères. Les points de contrôle peuvent varier selon le stade du cycle parasitaire (formes sanguines ou procycliques).

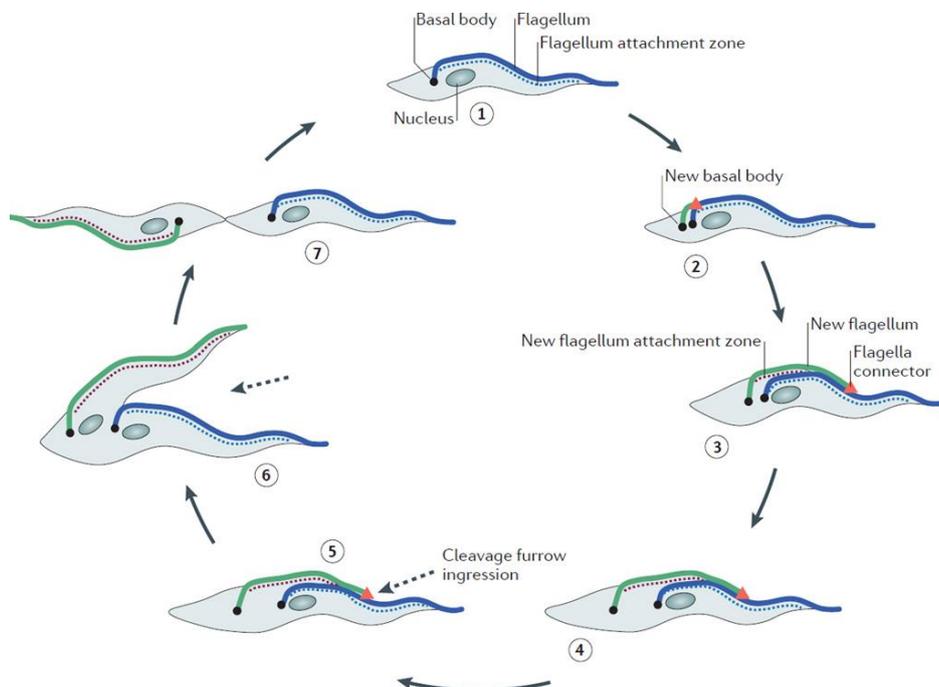
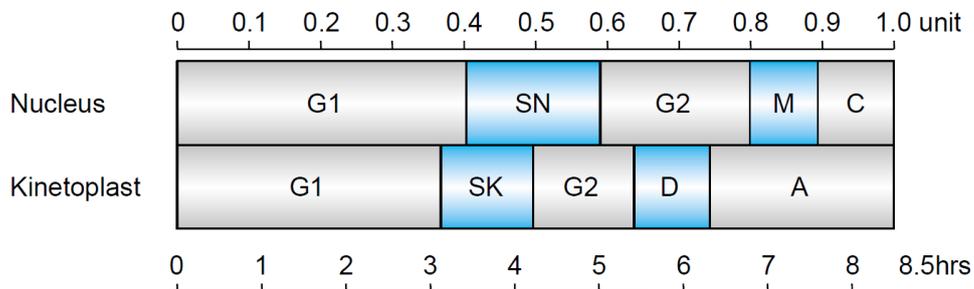


Figure 5 : Cycle de division cellulaire de *T. brucei*. En haut : déroulement d'un cycle de réplication du matériel génétique nucléaire et kinétoplastique. Le cycle du kinétoplaste débute avant celui du noyau mais est plus court. SN : phase S du noyau ; M : mitose ; C : cytotdiérèse (*cytokinesis*) ; SK : phase S du kinétoplaste ; D : ségrégation des kinétoplastes ; A : migration des corps basaux (*apportioning*) (McKean *et al.* 2003). En bas : événements morphologiques lors de la division (forme procyclique) (Langousis *et al.* 2014).

2.1.4 Cycle parasitaire

Les trypanosomes responsables de la maladie du sommeil chez l'Homme (*T.b. gambiense* et *T.b. rhodesiense*) sont transmis par des insectes hématophages du genre *Glossina* ou mouches tsé-tsé. Au moment d'un repas sanguin, la mouche tsé-tsé va ingérer avec le sang de l'hôte infecté des formes sanguines trypomastigotes du parasite (*Bloodstream form*, BSF). Ces parasites se transforment dans l'intestin de la glossine en trypomastigotes procycliques (forme non infectante) et se multiplient par scissiparité. Au stade procyclique, les trypanosomes évoluent dans le tube digestif de l'insecte, environnement basique riche en protéases. Les formes procycliques quittent l'intestin, se différencient en formes épimastigotes et migrent vers les glandes salivaires où elles se transforment en trypomastigotes métacycliques infectants (Vickerman *et al.* 1985). Les trypanosomes sont alors susceptibles d'être inoculés au niveau du tissu cutané d'un hôte mammifère par la piqûre du vecteur (Figure 6).

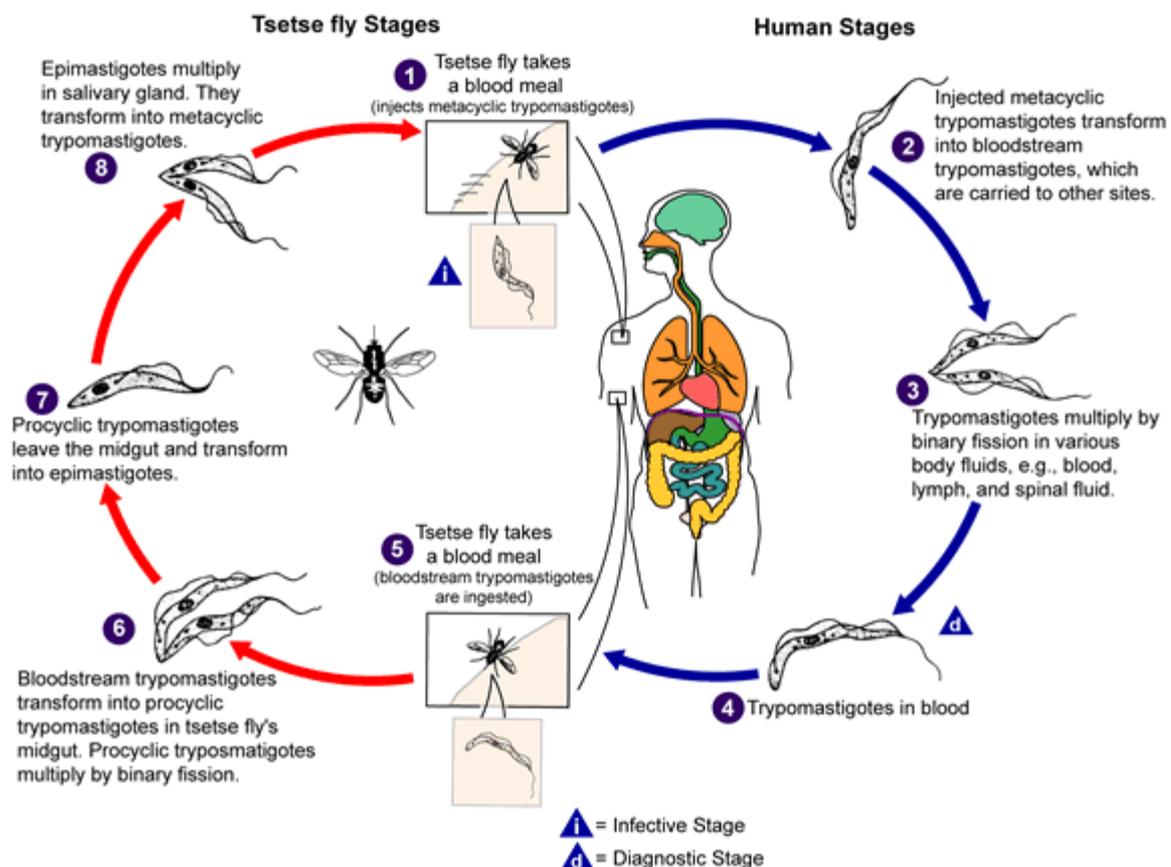


Figure 6 : Cycle parasitaire du trypanosome (Centers for Diseases Control, CDC, www.cdc.gov).

Une réaction inflammatoire peut se développer localement sur le site de piqûre de la mouche, appelé chancre d'inoculation. Les formes métacycliques se différencient en formes trypomastigotes longues (« *long slender forms* ») qui présentent des capacités accrues de mobilité et de multiplication. Le parasite présente également le phénomène de variation antigénique de la VSG qui lui permet de se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. La diffusion du parasite dans les différents tissus de l'hôte rend compte des signes cliniques observés et des stades de progression de la maladie. Les formes trypomastigotes longues se différencient en des formes plus courtes et plus trapues (« *short stumpy forms* ») qui sont non prolifératives. Cette différenciation dans le sang de l'hôte est indispensable pour la transmission du parasite à l'hôte insecte. En effet, l'accumulation des formes courtes limite la population de parasites réduisant le risque de mortalité de l'hôte et augmentant ainsi la probabilité de transmission des parasites. Ces formes trypomastigotes courtes subissent une dérégulation du contrôle des sites d'expression des gènes de la VSG (Amiguet-Vercher *et al.* 2004), ce qui préviendrait la transition des formes sanguines courtes vers les formes longues. Les formes trypomastigotes courtes sont transmises à l'insecte vecteur lors de la piqûre. Le cycle parasitaire peut ainsi se poursuivre avec la transmission à d'autres hôtes mammifères. Récemment, la présence de trypanosomes dans la peau de souris infectées a été observée. Ces trypanosomes appartiennent à un nouveau compartiment et participeraient à la transmission au vecteur (Capewell *et al.* 2016).

2.1.5 Présentation clinique

La THA évolue en plusieurs phases cliniques classiquement décrites : le chancre d'inoculation ou trypanome qui peut passer inaperçu, la phase de généralisation lymphatico-sanguine (stade 1) associée à une réaction inflammatoire disséminée avec vascularite, atteinte cutanée et viscérale et une activation immunitaire inefficace, la phase de polarisation cérébrale avec pénétration du parasite dans le système nerveux central (stade 2) suivie d'une leucoencéphalite mésoenchymateuse périvasculaire. La phase terminale est une leucoencéphalite auto-immune démyélinisante responsable d'un coma fébrile. L'évolution spontanée de la THA se fait en quelques années vers une cachexie terminale et le décès. Il

existe cependant des individus capables de se débarrasser de leurs parasites.

2.1.6 Traitement de l'infection

Le traitement est mis en œuvre après confirmation du diagnostic. Le diagnostic biologique au cours de la THA est souvent réalisé lors de campagnes de dépistage en zone d'endémie et commence par des tests sérologiques, notamment l'agglutination sur carte ou CATT (*Card Agglutination Test for Trypanosomiasis*). Les tests sérologiques permettent la sélection des sujets pour lesquels les techniques parasitologiques doivent être utilisées. Ces techniques visent à la recherche des parasites par ponction ganglionnaire ou dans le sang, sur frottis simple ou après techniques de concentration (centrifugation en tube capillaire ou par passage à travers une colonne de diéthyl-amino-éthyle (DEAE) cellulose, suivie d'une centrifugation de l'éluat. Une fois le diagnostic posé, l'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) permet de différencier les stades 1 et 2 de l'infection (présence de trypanosomes, nombre de cellules/ μL), afin de déterminer le traitement adéquat.

Le traitement de la THA repose sur des médicaments anti-trypanosomaux spécifiques et sur la prise en compte et le traitement des situations pathologiques associées comme les infections bactériennes concomitantes, le paludisme, la présence d'une anémie profonde, d'un état de déshydratation et de dénutrition. Les médicaments anti-trypanosomaux font l'objet de dons à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) par les firmes pharmaceutiques Bayer (Allemagne) et Sanofi-Aventis (France). Les produits peuvent être commandés auprès de l'OMS.

Infection à *T.b. gambiense* stade 1

Au cours de la THA à *T.b. gambiense*, le traitement de la phase lymphatico-sanguine (stade 1) repose sur l'usage de la pentamidine (pentamidine isétionate, Pentacarinat[®]) depuis plusieurs décennies. La pentamidine est également efficace pour traiter les leishmanioses et les pneumopathies à *Pneumocystis jirovecii*. Elle est concentrée dans le cytoplasme des cellules du trypanosome grâce à un transporteur actif. Des souches sont résistantes par suppression de ce mécanisme de transport (de Koning *et al.* 2001). La pentamidine se lie à l'ADN et l'ARN

notamment au niveau de l'ADN du kinétoplaste. Le mécanisme d'action précis reste non connu mais il a été observé que la pentamidine induit des perturbations du métabolisme du glucose, ainsi qu'un blocage de la phosphorylation oxydative et de la synthèse de certaines protéines. La pentamidine est administrée quotidiennement par voie intra-musculaire ou par voie intra-veineuse lente pendant sept jours. Les effets indésirables les plus fréquents sont une douleur au site d'injection (rarement compliquée d'abcès septique ou aseptique), un épisode d'hypoglycémie ou d'hypotension. Des aliments ou boissons sucrés sont proposés au patient avant l'administration, et il est recommandé de rester allongé au moins une heure après l'injection. Les complications sévères comme les réactions anaphylactiques et les pancréatites cliniques surviennent rarement.

Infection à *T.b. gambiense* stade 2

Le mélarsoprol (ou Mel B, Arsobal[®]), un dérivé de l'arsenic, a été découvert en 1949 et a longtemps été le seul traitement pour le stade 2 de l'infection à *T.b. gambiense*. Les concentrations observées au niveau cérébral sont très inférieures aux concentrations plasmatiques (de l'ordre du centième) mais restent suffisantes pour entraîner un effet trypanocide. Le principal mécanisme d'action du mélarsoprol est une inhibition trypanothion réductase. Ce dernier mécanisme expose le trypanosome aux radicaux libres toxiques. Il s'agit d'un traitement mal toléré avec de nombreux effets indésirables tels l'encéphalopathie arsénicale (fréquence 5 à 10% et mortalité de l'ordre de 50%), des neuropathies périphériques, une toxicité hépatique, des éruptions cutanées et des phlébites. En outre, des taux d'échecs élevés ont été rapportés dans plusieurs zones d'endémie.

L'éflornithine (α -difluorométhylornithine ou DFMO, Ornidyl[®]) est un inhibiteur de la première étape de la biosynthèse des polyamines, c'est-à-dire la formation de putrescine à partir de l'ornithine par l'ornithine décarboxylase (Bacchi *et al.* 1980). Son passage dans le LCR est relativement important. Sa concentration y reste cependant inférieure à la concentration sanguine. Une meilleure tolérance de l'éflornithine comparativement au mélarsoprol a été démontrée au cours d'études cliniques (Balasegaram *et al.* 2009)(Chappuis *et al.* 2005) et l'éflornithine a progressivement remplacé le mélarsoprol comme traitement de première intention. Un usage très large de l'éflornithine a cependant été limité par les contraintes liées

aux nombreuses perfusions (56 perfusions de plus de 30 min sur 14 jours). Dans le but de raccourcir et simplifier la durée du traitement basé sur l'éflornithine, celle-ci a été proposée en combinaison avec le nifurtimox (Lampit[®]). Le nifurtimox est un nitrofurane déjà utilisé dans le traitement de la maladie de Chagas. Son mécanisme d'action serait double : d'une part toxicité sur l'ADN parasitaire et, d'autre part, formation et accumulation d'anion superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de radicaux hydroperoxydes toxiques pour le trypanosome. Le NECT a montré sa non-infériorité par comparaison avec le traitement standard par éflornithine au cours de la THA (Priotto *et al.* 2009).

Infection à *T.b. rhodesiense* stades 1 et 2

Au cours de la THA à *T.b. rhodesiense*, le traitement de la phase lymphatico-sanguine repose sur la suramine (Moranyl[®], Germanin[®]), par voie intra-veineuse selon un schéma s'échelonnant sur 30 jours. La suramine inhibe des enzymes de la glycolyse. Les cibles enzymatiques les mieux identifiées sont la glycérol-3-phosphate oxydase et la glycéraldéhyde-3-phospho-deshydrogénase. Les effets indésirables sont la néphrotoxicité, la survenue de neuropathies périphériques et la toxicité médullaire. Ces effets indésirables sont généralement modérés et réversibles. Une réaction d'hypersensibilité aiguë peut survenir, faisant généralement recourir à une faible dose test initiale. *T.b. rhodesiense* n'est pas sensible à l'éflornithine. En conséquence, le mélarsoprol reste le seul traitement efficace pour les patients au stade encéphalitique, malgré le mauvais profil de tolérance de cette molécule. Un schéma de traitement de dix jours en une injection quotidienne est maintenant validé (Burri *et al.* 2000). Les différents schémas de traitements sont résumés dans le Tableau 1. D'autres molécules sont en cours d'évaluation dans la THA telles le féxinidazole (Torreele *et al.* 2010)(Bahia *et al.* 2014) ou les oxaboroles (Jones *et al.* 2015).

Surveillance clinique et biologique

Un suivi après le traitement devrait être proposé à tous les patients, à 6 mois et à 2 ans. Cependant, l'adhésion habituellement faible au suivi en zone d'endémie rend souhaitable de chercher à raccourcir ces délais. Une étude a montré que la plupart des patients peuvent être classés 6 mois après le traitement comme guéris

(absence de trypanosomes et ≤ 5 éléments/ μL dans le LCR) ou en rechute (présence de trypanosome ou > 50 éléments/ μL dans le LCR), le statut des patients restants pouvant être établi à 12 mois en utilisant la valeur seuil de 20 éléments/ μL dans le LCR (Mumba Ngoyi *et al.* 2010).

Tableau 1 : Description des traitements utilisés dans la THA (d'après Malvy *et al* 2011)(Burri *et al.* 2010)

	Traitements de première ligne	Posologies	Alternatives
<i>T.b. gambiense</i>			
Stade 1	Pentamidine	4 mg/kg/jour IM ou IV (sur 2 heures) x 7 jours	*
Stade 2	NECT	Eflornithine 400mg/kg/jour IV en 2 perfusions (sur 1 heure) x 7 jours + nifurtimox 15 mg/kg/jour per-os en 3 prises / jour x 10 jours	Eflornithine 400 mg/kg/jour IV en 4 perfusions x 14 jours ou (2° ligne) : Mélarsoprol 2,2 mg/kg/jour IV x 10 jours
<i>T.b. rhodesiense</i>			
Stade 1	Suramine	Dose test de 4-5 mg/kg IV à J1 puis 20 mg/kg IV hebdomadaire x 5 semaines (dose maximum par injection : 1g)	*
Stade 2	Mélarsoprol	2,2 mg/kg/jour IV x 10 jours	3 séries de 3,6 mg/kg/jour IV pendant 3 jours, espacées de 7 jours

IM : intra-musculaire, IV : intra-veineuse

* Le diminazène (Bérénil[®]) a été utilisé. Il n'est actuellement autorisé que pour l'usage vétérinaire.

2.2 La biosynthèse des stérols, cible thérapeutique dans la THA

2.2.1 Les stérols

Les stérols sont des lipides possédant un noyau stérane (un alcane quadricyclique : perhydrocyclopentanophénanthrène) dont le carbone 3 est porteur d'un groupe hydroxyle (Figure 7). Ils sont parfois utilisés comme biomarqueurs de la présence de cellules eucaryotes (Waldbauer *et al.* 2011).

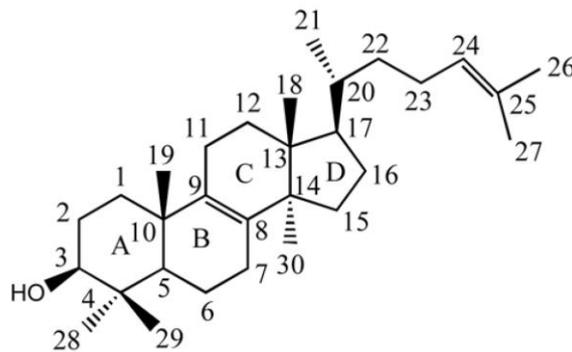


Figure 7 : nomenclature des atomes de carbones des stérols, International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry, 1989 (Lepesheva *et al.* 2011).

Les stérols (le cholestérol chez les vertébrés, l'ergostérol chez les champignons, le sitostérol chez les végétaux) sont indispensables à la formation des membranes (Nes *et al.* 1977). Ils sont également impliqués dans la fluidité et la perméabilité de ces membranes en modulant l'activité des protéines et des canaux ioniques présents. En effet, le cholestérol et les sphingolipides participent à la constitution de radeaux lipidiques qui forment des structures rigides dans la membrane et sont des zones privilégiées pour certaines protéines. Ces radeaux lipidiques ont un rôle essentiel dans la signalisation cellulaire en permettant la concentration de protéines impliquées dans certaines fonctions physiologiques, par exemple l'exocytose. La participation des sphingolipides et de certains stérols à la formation de radeaux lipidiques a été montrée chez *T. brucei* (Denny *et al.* 2001)(Tyler *et al.* 2009)(Serricchio *et al.* 2015). En outre, les stérols sont les précurseurs de molécules actives à de très faibles concentrations (de l'ordre du nano-molaire) qui sont impliquées dans la régulation des processus de croissance

et de développement chez de nombreux organismes (Edwards *et al.* 1999). L'importance des hormones stéroïdes chez les animaux et les plantes est bien établie. Certaines données indiquent que certains stérols présentent également des rôles de régulations proches chez les champignons (Dahl *et al.* 1987)(Parks *et al.* 1995)(Goldstein *et al.* 2006) ainsi que chez les *Trypanosomatidae* (Roberts *et al.* 2003)(Zhou *et al.* 2007). Il a ainsi été proposé que les stérols puissent jouer un rôle « métabolique » dans la régulation du cycle cellulaire. Ce rôle, parfois également nommé « *sterol sparking* », est imprécis. Il a été rapporté chez les champignons, des effets de l'ergostérol sur le métabolisme des phospholipides et sur une protéine kinase impliquée dans le cycle cellulaire (Dahl *et al.* 1987).

2.2.2 Biosynthèse des stérols chez les *Trypanosomatidae*

La voie de biosynthèse des stérols est présente chez les organismes eucaryotes, et a joué un rôle dans leur diversification au cours de l'évolution (Rohmer *et al.* 1979)(Volkman *et al.* 2005). Certains protozoaires, comme *Plasmodium*, ne possèdent pas dans leur génome de séquences codant pour la voie de biosynthèse des stérols. En revanche, il a été montré par séquençage que les gènes codants pour les enzymes de cette voie de biosynthèse sont présents chez de nombreux *Trypanosomatidae* (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *L. major*, *L. infantum*, *L. brasiliensis*, *L. amazonensis*) (Lepesheva *et al.* 2011).

Chez les *Trypanosomatidae*, la biosynthèse des stérols débute à partir de l'acétyl-CoA vers la production de mévalonate, de farnésyl-pyrophosphate puis de squalène et de 2,3-oxidosqualène. Chez *T. brucei*, le glucose est la principale source de carbone pour la production d'acétyl-CoA dans la mitochondrie (Rivière *et al.* 2009). La cyclisation du 2,3-oxidosqualène en lanostérol est similaire aux champignons et aux animaux mais est différente au niveau des plantes et des algues qui produisent du cycloarténol. Ceci est en accord avec des données phylogénétiques en faveur d'une évolution divergente des *Trypanosomatidae* à partir d'un ancêtre autre qu'un organisme présentant une photosynthèse (El-Sayed *et al.* 2005). Les étapes suivantes comportent des réactions de déméthylation et de modification des cycles stérols et de la chaîne C20-27 (Figure 8). La séquence précise de ces différentes étapes est incomplètement connue. Chez les

Trypanosomatidae, la voie de biosynthèse des stérols conduit à la production d'ergostérol et de ses dérivés 24-méthylés et alkylés (Zhou *et al.* 2007)(Lepesheva *et al.* 2007). Contrairement aux autres *Trypanosomatidae*, les formes sanguines de *T. brucei* ont la particularité d'utiliser le cholestérol plasmatique de leur hôte pour la constitution de leurs membranes (Coppens *et al.* 1988). Néanmoins, il a été montré que la voie de biosynthèse endogène des stérols reste active, y compris dans des conditions où le cholestérol est disponible en abondance (Zhou *et al.* 2007)(Nes *et al.* 2012). Les faibles quantités de dérivés de l'ergostérol produites par le parasite ($<10^{-15}$ g/parasite) suggèrent que, au cours de son cycle chez le mammifère, *T. brucei* utilise les stérols endogènes pour un rôle métabolique ou de signalisation (Nes *et al.* 2012).

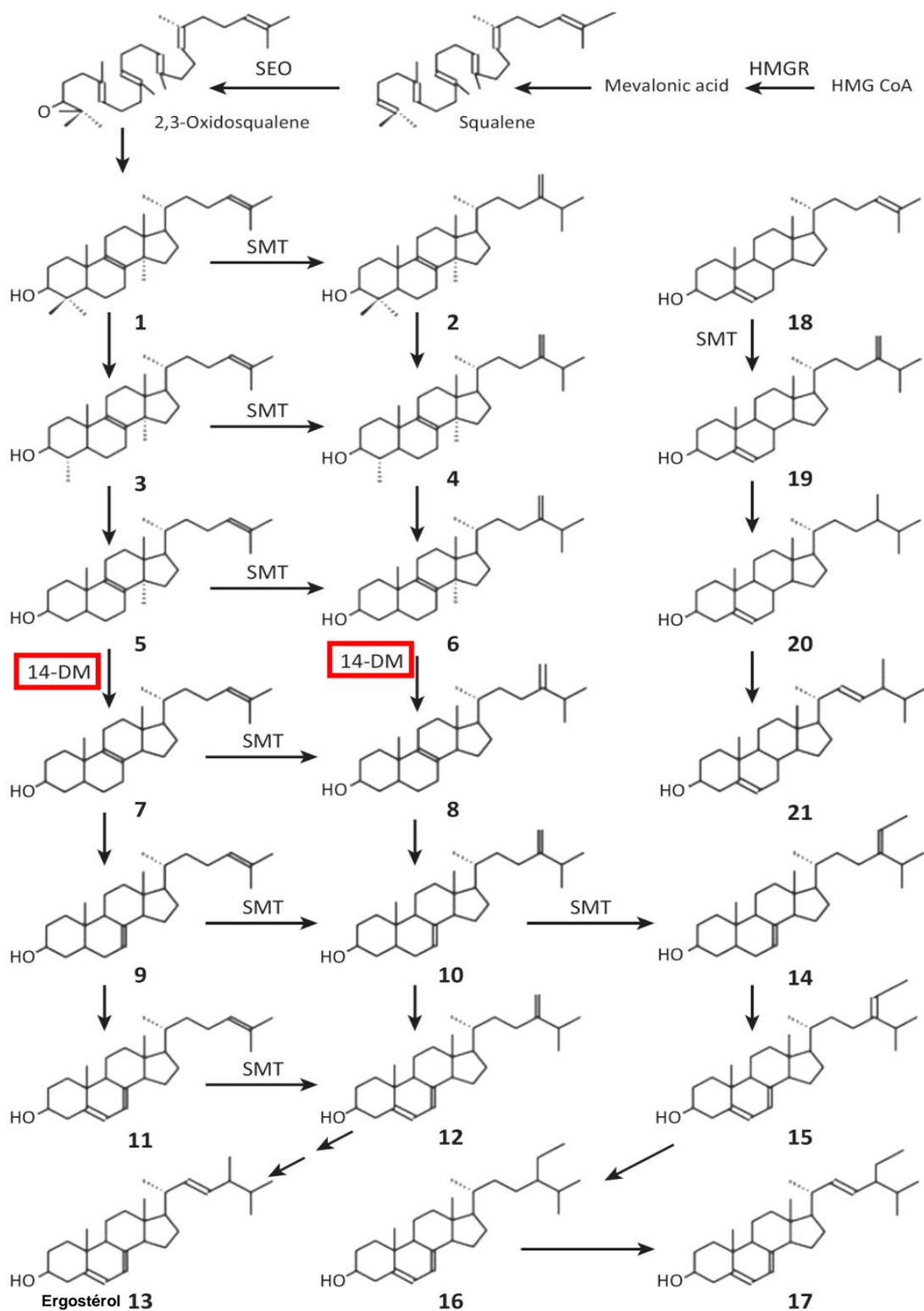


Figure 8 : Biosynthèse des stérols chez les *Trypanosomatidae*. (1) Lanostérol. (2) 24-Méthylènedihydrolanostérol. (3) 4 α ,14 α -Diméthylcholesta-8,24-dien-3 β -ol. (4) 4 α ,14 α -Diméthylergosta-8,24-dien-3 β -ol. (5) 14 α -Méthylcholesta-8,24-dien-3 β -ol. (6) 14 α -Méthylergosta-8,24-dien-3 β -ol. (7) Zymostérol (8) Ergosta-8,24-dien-3 β -ol. (9) Cholesta-7,24-dien-3 β -ol. (10) Ergosta-7,24-dien-3 β -ol. (11) Cholesta-5,7,24-trien-3 β -ol. (12) Ergosta-5,7,24-trien-3 β -ol. (13) Ergostérol. (14) Stigmasta-7,24-dien-3 β -ol. (15) Stigmasta-5,7,24-trien-3 β -ol. (16) Stigmasta-5,7-dien-3 β -ol. (17) Stigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol. (18) Dermostérol. (19) Ergosta-5,24-dien-3 β -ol. (20) Ergost-5-en-3 β -ol. (21) Ergosta-5,22-dien-3 β -ol. **Abréviations** : HMG CoA, 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A; HMGR, HMG CoA réductase; SEO, squalène-2,3-époxydase; 14-DM, C14 α -stérol déméthylase; SMT, S-adénosyl-L-méthionine C24- Δ -stérol méthyltransférase. (Roberts *et al.* 2003)

2.2.3 CYP51

CYP51 (stérol 14 α -déméthylase) est un des éléments de la famille 51 de la superfamille du cytochrome P450. Cette superfamille rassemble des hémoprotéines impliquées dans le métabolisme de substances organiques et la biosynthèse de stéroïdes, de lipides, et de vitamines, chez les eucaryotes. Le terme P450 provient de la longueur d'onde du pic maximum d'absorption de ces enzymes en spectrophotométrie lorsqu'elles sont à l'état réduit (450 nm). CYP51 est connue et étudiée depuis 40 ans (Mitropoulos *et al.* 1976)(Nes *et al.* 1977)(Trzaskos *et al.* 1984). Cette enzyme a été purifiée pour la première fois à partir de *Sacharomyces cerevisiea* en 1984 (Yoshida *et al.* 1984).

CYP51 de *T. brucei* est codée par une seule copie de gène situé sur le chromosome 11 (TriTrypB *database*, *gene number* Tb11.02.4080, <http://tritrypdb.org>). Ce gène code une protéine de 481 acides aminés et de masse moléculaire 51,5 kDa. La structure de la protéine a été étudiée et comporte 12 hélices α majeures (A à L), 10 hélices α mineures et 12 feuillets β assemblés en 4 boucles (Figure 9). L'arrangement spatial diffère fortement de celui des bactéries (Lepesheva *et al.* 2010).

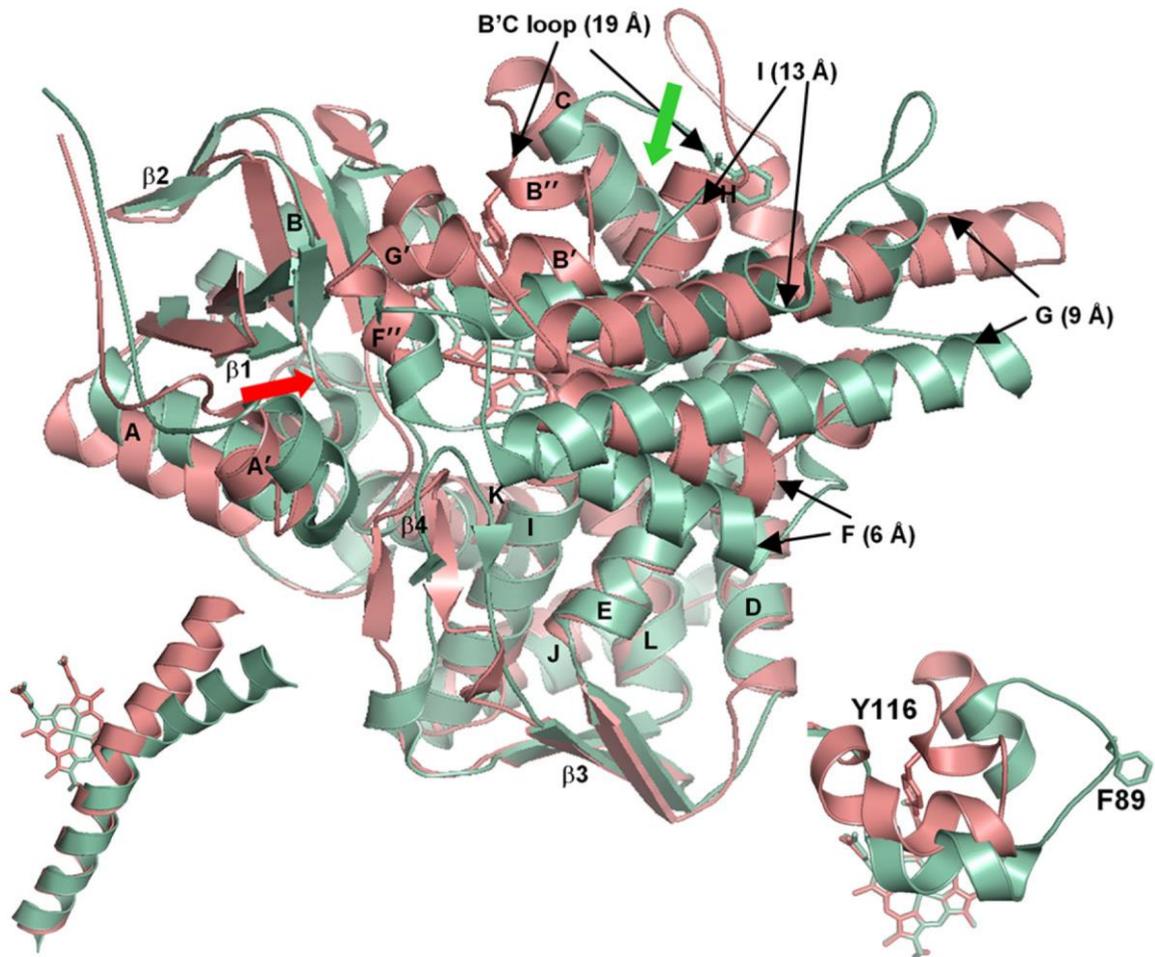


Figure 9 : CYP51 de *T.b. brucei* (rosé) et CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis* (vert, en superposition). Les régions en relation avec le site actif qui sont les plus divergentes sont indiquées par des flèches noires et leurs distances sont notées entre parenthèses. Les localisations des sites d'entrée du substrat sont indiquées par les flèches rouges et vertes pour *T.b. brucei* et *M. tuberculosis*, respectivement. En bas à gauche : rapport de l'hème et de l'hélice I. En bas à droite : rapport de l'hème et de la boucle BC (vue supérieure). (Lepesheva *et al.* 2010).

CYP51 est une monooxygénase qui catalyse une réaction en trois étapes de déméthylation en C14 du noyau stérol (Figure 10).

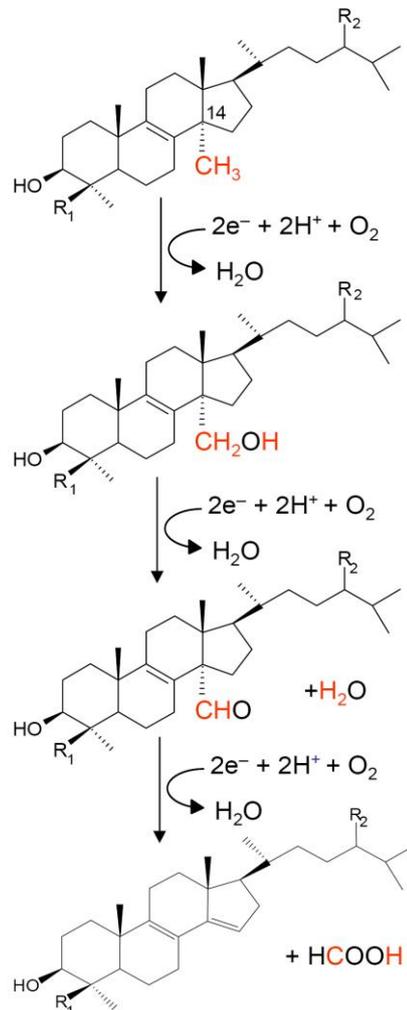


Figure 10 : Trois étapes de déméthylation en C14 par CYP51. Le donneur d'électrons est le NADPH. R1 (H ou CH3) et R2 (H ou =CH) varient selon l'espèce étudiée. (Lepesheva *et al.* 2011)

L'identité des séquences d'acides aminés est environ de 30% dans la famille CYP51 parmi tous les organismes. Elle est très élevée chez les espèces proches sur plan phylogénétique, par exemple 95% chez les mammifères. Elle est moins élevée chez les *Trypanosomatidae* qui présentent 80% d'identité entre les séquences de CYP51. Ces séquences diffèrent fortement entre les *Trypanosomatidae* et l'Homme avec seulement 25% d'identité (Lepesheva *et al.* 2007)(Chen *et al.* 2010) (Figure 11).

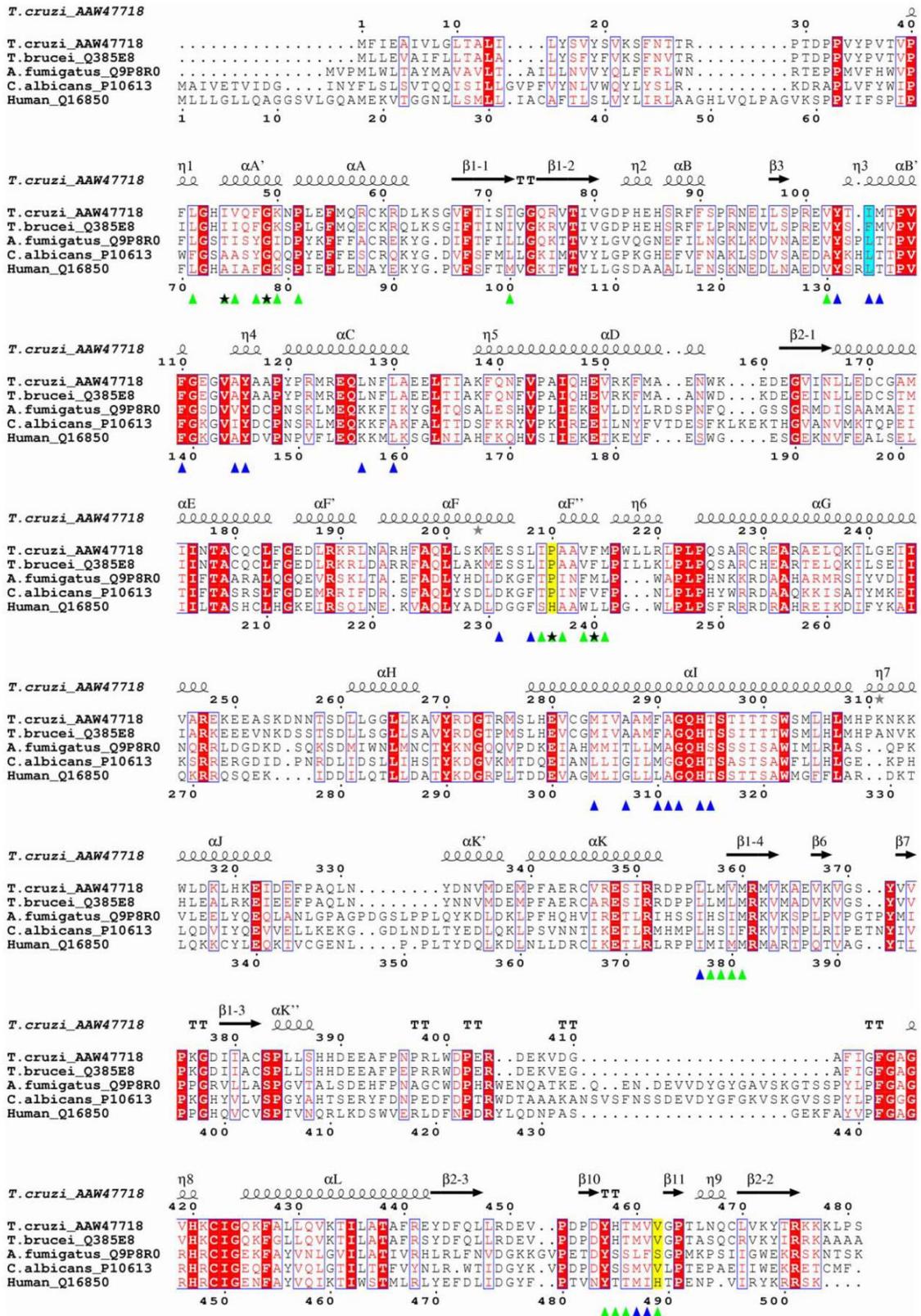


Figure 11 : Alignement de séquences d'acides aminés de CYP51 humaine et de différents pathogènes dont *T.b. brucei*. Bases de données Swiss-Prot/TrEMBL et NCBI. Les annotations à la partie supérieure se réfèrent à *T. cruzi* et celles du bas à l'Homme. Les acides aminés pouvant être situés à ≤ 7 Å d'une molécule de fluconazole (un dérivé azolé) sont indiqués en triangles bleus. Les acides aminés participant au tunnel hydrophobe sont indiqués en triangles verts. Les mutations clés correspondant à l'entrée du tunnel sont indiquées par une étoile noire. (Chen *et al.* 2010).

2.2.4 Rôle essentiel de CYP51 chez certains *Trypanosomatidae*

Nous avons utilisé dans un de nos travaux la technique d'interférence à ARN (ARNi) pour évaluer l'importance de CYP51 chez *T. brucei*. Nous allons expliquer ici cette approche. L'ARNi est utilisée très fréquemment pour l'identification de protéines essentielles chez *T. brucei*, par exemple pour étudier le rôle d'enzymes impliquées dans le métabolisme (Alsford *et al.* 2011). Historiquement, l'interférence à ARN a été découverte fortuitement lors de manipulations génétiques de souches de pétunias visant à en modifier la couleur (Napoli *et al.* 1990). Par la suite, a été décrit chez *Caenorhabditis elegans*, le phénomène de dégradation de l'ARNm déclenché par l'ARN double brin, et médié par un complexe nucléoprotéique (Fire *et al.* 1998) (Figure 12). Ce mécanisme s'avère largement répandu dans le monde eucaryote. Il est utilisé de façon détournée à des fins expérimentales dans des stratégies de génétique inverse.

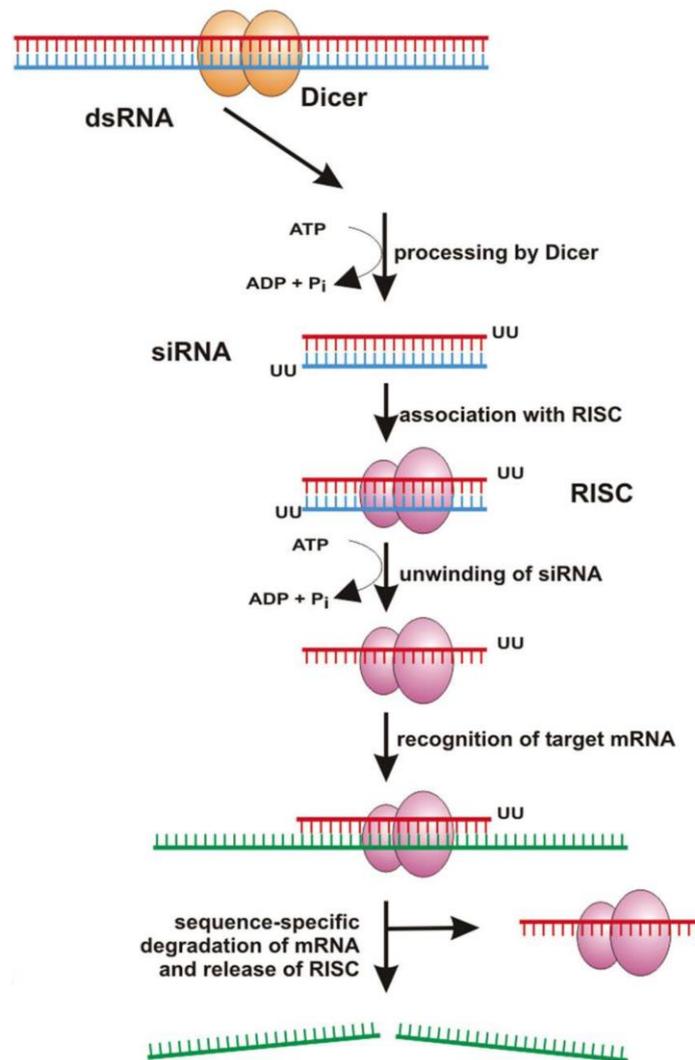


Figure 12 : Mécanisme d'interférence à ARN. L'ARN double brin est pris en charge par l'endonucléase Dicer qui le clive en fragments d'environ 40 bases. Les fragments d'ARN générés sont alors intégrés au complexe RISC lequel les oriente vers un ARNm qui leur est complémentaire. Cet ARN est alors dégradé par le complexe RISC.

Chez *T. brucei*, le mécanisme d'ARNi est présent et actif (Ngô *et al.* 1998)(Bastin *et al.* 1998). Il est possible, en faisant exprimer aux cellules un ARN double brin correctement choisi, de diminuer spécifiquement le niveau d'ARNm dont la séquence correspond à celle de l'ARN double brin. *T. brucei* est ainsi devenu un modèle expérimental de choix car il permet d'étudier les conséquences de la régulation de l'expression de gènes par l'usage de l'ARNi (Motyka *et al.* 2004). Les lignées 90-13 (forme sanguine) et 29-13 (forme procyclique) co-expriment de façon stable l'ARN polymérase du bacteriophage T7 et le répresseur de la tétracycline (Wirtz *et al.* 1999). Ces lignées apportent ainsi les éléments nécessaires pour le

fonctionnement d'un vecteur codant pour l'ARN interférence. Différents vecteurs dont pZJM et p2T7^{Ti} permettent l'expression inductible de l'ARN double brin choisi, encadré par deux promoteurs T7 contrôlés par les répresseurs tétracycline (Wang *et al.* 2000)(LaCount *et al.* 2000).

L'ARNi a été précédemment utilisée chez *T. brucei* pour l'étude de certaines enzymes de la voie de biosynthèse des stérols comme la stérol méthyl-transférase et la farnésyl pyrophosphate-synthase (Montalvetti *et al.* 2003)(Haubrich *et al.* 2015). Les données manquent concernant le caractère essentiel de CYP51 chez *T. brucei*. Certaines données existent cependant chez les leishmanies. Ainsi, chez *Leishmania major*, les mutants doubles KO pour CYP51 sont viables mais montrent une diminution de la croissance, des anomalies de cytodivision et une sensibilité accrue au stress induit par la chaleur (Xu *et al.* 2014). Le caractère essentiel de CYP51 a été mis en évidence chez *Leishmania donovani* par Mc Call *et al.* en 2015. Ces auteurs ont observé que *L. donovani* peut tolérer une réduction de plus de 50% du niveau de protéine CYP51 sans conséquence sur le phénotype (McCall *et al.* 2015). Le caractère essentiel de CYP51 a été confirmé avec des mutants doubles KO viables exclusivement en présence d'une source plasmidique de CYP51.

2.2.5 Médicaments interférant avec la biosynthèse des stérols

Plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des stérols sont des cibles de médicaments. En thérapeutique humaine, l'HMG-CoA réductase est la cible des médicaments de la classe des statines (traitement de la dyslipidémie), la farnésyl diphosphate synthase est la cible des bisphosphonates (traitement de l'ostéoporose et de la maladie de Paget).

Différentes classes médicamenteuses ont montré une activité vis-à-vis des *Trypanosomatidae* : les inhibiteurs de la squalène synthase, de la squalène époxidase, de la stérol méthyltransférase et les azolés qui inhibent CYP51. Ces inhibiteurs de la biosynthèse de l'ergostérol induisent des altérations de l'ultrastructure de différentes organelles des *Trypanosomatidae*. Ces altérations intéressent la mitochondrie et son kinétoplaste, le réticulum endoplasmique, le

Golgi, le noyau, le flagelle et la membrane plasmique (de Souza *et al.* 2009)(de Macedo-Silva *et al.* 2013) (Figure 13).

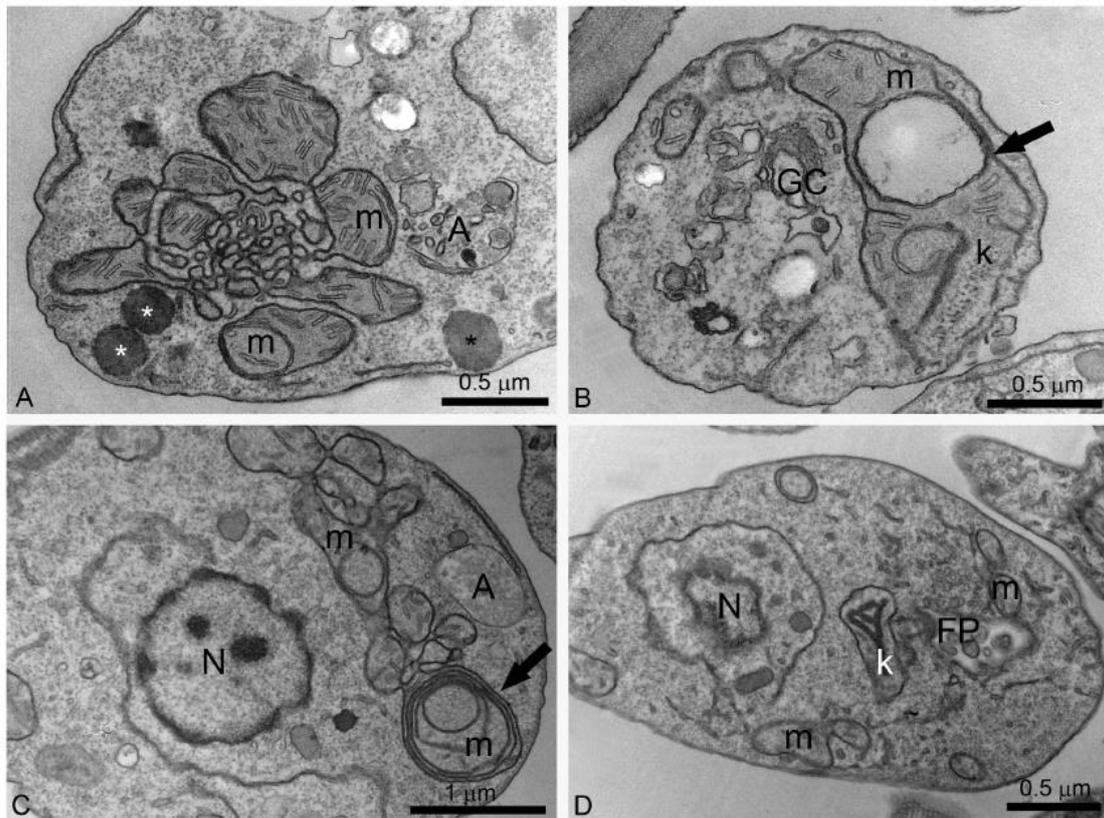


Figure 13 : Formes promastigotes de *L. amazonensis* cultivées avec de l'itraconazole ou du posaconazole observées en microscopie électronique. A et B : itraconazole (1 μ M). C et D : posaconazole (1 μ M). Présence d'une désorganisation et d'un élargissement de la mitochondrie/kinétoplaste (A, B, D). Altération de la mitochondrie et apparition de corps circulaires (B et C, flèches). Modifications de la structure du kinétoplaste (B et D). Présence d'autophagosomes (A, C et D). Vacuoles comportant des portions de membrane et de cytoplasme (A, astérisques). FP, poche flagellaire ; GC, corps de Golgi ; k, kinétoplaste; m, mitochondrie; N, noyau, A, autophagosome. (de Macedo-Silva *et al.* 2013)

Les inhibiteurs de la squalène synthase

Historiquement, la squalène synthase a été étudiée comme cible potentielle de médicaments visant à traiter la dyslipidémie. Les acides zaragoziques et les quinuclidines sont des inhibiteurs de cette enzyme. La 3-(biphenyl-4-yl)-3-hydroxyquinuclidine a ainsi montré sa capacité à diminuer le taux de cholestérol dans un modèle animal. Par la suite, les acides zaragoziques et les quinuclidines ont fait l'objet de différents travaux chez les *Trypanosomatidae* (Urbina *et al.*

2002)(Urbina *et al.* 2004)(Rodrigues *et al.* 2008)(Bergstrom *et al.* 1995)(Braga *et al.* 2004)(Lorente *et al.* 2005)(Rodrigues *et al.* 2005)(Cammerer *et al.* 2007)(Sealey-Cardona *et al.* 2007).

Les inhibiteurs de la squalène époxidase

Les allylamines sont des inhibiteurs de la squalène époxidase. Parmi celles-ci, la terbinafine est utilisée en clinique humaine comme antifongique, sous forme topique ou par voie orale. La terbinafine inhibe la croissance des formes promastigotes et amastigotes de *Leishmania*, avec des effets sur l'ultrastructure du parasite, en particulier la mitochondrie (Vannier-Santos *et al.* 1995). Les valeurs des IC₅₀ de la terbinafine sont de 1 µM et 100 nM respectivement pour les formes promastigotes et amastigotes. En combinaison avec le kétoconazole, les IC₅₀ sont d'environ 1 nM, montrant l'intérêt d'une inhibition combinée de plusieurs étapes de la voie de biosynthèse de l'ergostérol.

Les inhibiteurs de la stérol méthyltransférase

Les azastérols inhibent l'enzyme stérol méthyltransférase. Cette enzyme n'est pas présente chez les mammifères et est spécifique des champignons et des *Trypanosomatidae*. L'activité antifongique des azastérols a été décrite pour *Candida spp.* (Barrett-Bee *et al.* 1992)(Ishida *et al.* 2009), *Pneumocystis jirovecii* (Urbina *et al.* 1997) et *Paracoccidioides brasiliensis* (Visbal *et al.* 2003). L'effet des azastérols a été montré sur *T. cruzi* (Urbina *et al.* 1996)(Liendo *et al.* 1999)(Magaraci *et al.* 2003), sur *Leishmania* (Roberts *et al.* 2003)(Rodriguez *et al.* 2002)(Jiménez-Jiménez *et al.* 2008)(Magaraci *et al.* 2003) et sur *T. brucei* (Gros *et al.* 2006)(Haubrich *et al.* 2015). Leur effet sur l'enzyme stérol méthyltransférase est cependant limité. Ils peuvent avoir un effet synergique en combinaison avec les azolés (Urbina *et al.* 1996).

Les azolés

La découverte de l'activité antifongique des imidazolés a constitué une avancée considérable dans la thérapeutique des infections fongiques superficielles et systémiques. Ils inhibent CYP51. Les azolés de première génération correspondent à une grande variété de composés comme le miconazole. Le

kétoconazole est le principal représentant des azolés de seconde génération. Il s'agit du premier imidazolé bien absorbé par voie orale mais son hépatotoxicité et ses interactions médicamenteuses limitent son utilisation. Les azolés de troisième génération correspondent aux dérivés triazolés : fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole. Leurs propriétés pharmacologiques et leur tolérance généralement satisfaisantes permettent de les utiliser dans les infections systémiques. Les imidazolés sont caractérisés sur le plan chimique par des structures pentacycliques à deux atomes d'azote, munis d'une chaîne complexe portée par l'un des atomes d'azote. Les triazolés sont caractérisés par des structures similaires mais dont le pentacycle comporte trois atomes d'azote (Figure 14).

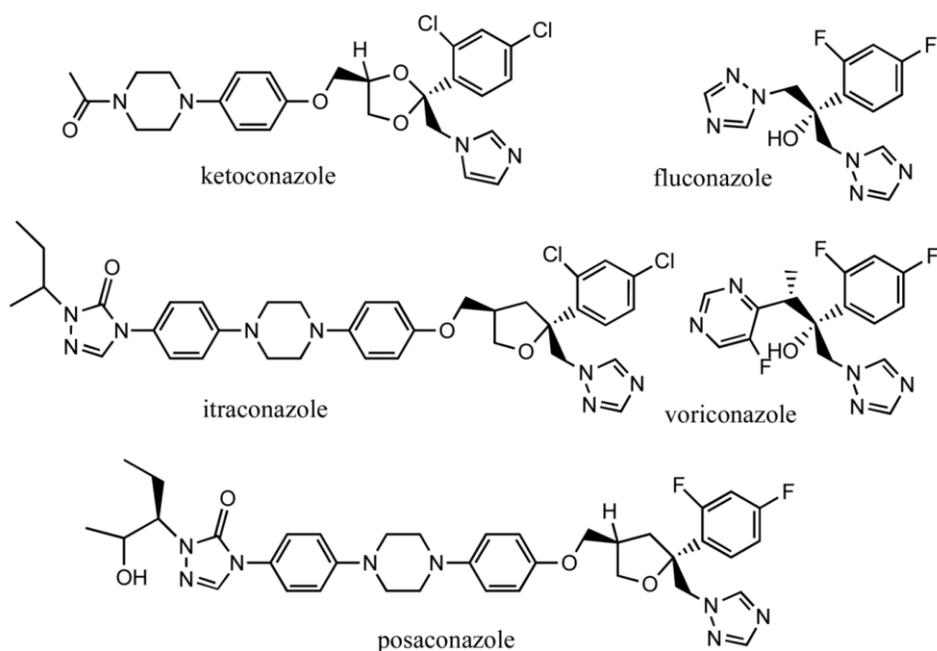


Figure 14 : Antifongiques azolés : exemple de cinq molécules utilisées en clinique humaine. (Lepesheva *et al.* 2011)

L'activité des azolés chez les *Trypanosomatidae* a été montrée pour *T. cruzi*, *T. brucei*, ainsi que pour les leishmanies (Pomel *et al.* 2015). L'effet du kétoconazole a été testé *in vitro* en combinaison avec d'autres inhibiteurs de la biosynthèse des stérols chez *T. cruzi* (Vivas *et al.* 1996). De même, l'activité du

posaconazole a été montrée chez *T. cruzi*, avec un effet synergique en combinaison avec l'amiodarone (Benaim *et al.* 2006). L'effet de l'amiodarone s'expliquerait par le blocage de canaux potassiques et calciques. Le kétoconazole a une activité sur les formes sanguines et les formes procycliques de *T. brucei* (Lepesheva *et al.* 2007). Le kétoconazole et le posaconazole ont montré un effet *in vivo* au cours de modèles expérimentaux d'infection à *Leishmania amazonensis* et *L. donovani* (Al-Abdely *et al.* 1999)(de Macedo-Silva *et al.* 2013). De même, le posaconazole a montré une efficacité comme traitement dans des modèles murins d'infections aiguës et chroniques à *T. cruzi* (Molina *et al.* 2000).

La liaison du fluconazole et du posaconazole à CYP51 a été mise en évidence chez *T. cruzi* et *T. brucei* (Chen *et al.* 2010). Il est connu que l'effet inhibiteur enzymatique des azolés varie fortement en fonction de la partie de la molécule non liée au site actif (Ortiz de Montellano *et al.* 1995). En effet, de petites molécules comme les imidazolés ont une influence limitée sur l'activité de l'enzyme, alors que des molécules de plus grande taille peuvent être de meilleurs inhibiteurs. Après sa liaison au site actif, la queue de la molécule de posaconazole est en partie localisée à l'extérieur du tunnel hydrophobe. Elle présente à ce niveau une zone d'interaction avec des acides aminés situés à l'entrée du tunnel, ce qui constitue un site de liaison supplémentaire (Figure 15). La variabilité de CYP51 entre les différents *Trypanosomatidae* rend compte de la variabilité de l'effet d'un même azolé d'une espèce à l'autre. Ainsi, par exemple, l'effet plus important du fluconazole sur *T. cruzi* comparativement à *L. infantum* et *T. brucei* est lié au positionnement différent de deux tyrosines directement en rapport avec l'hème (Y103 et Y106) (Lepesheva *et al.* 2011).

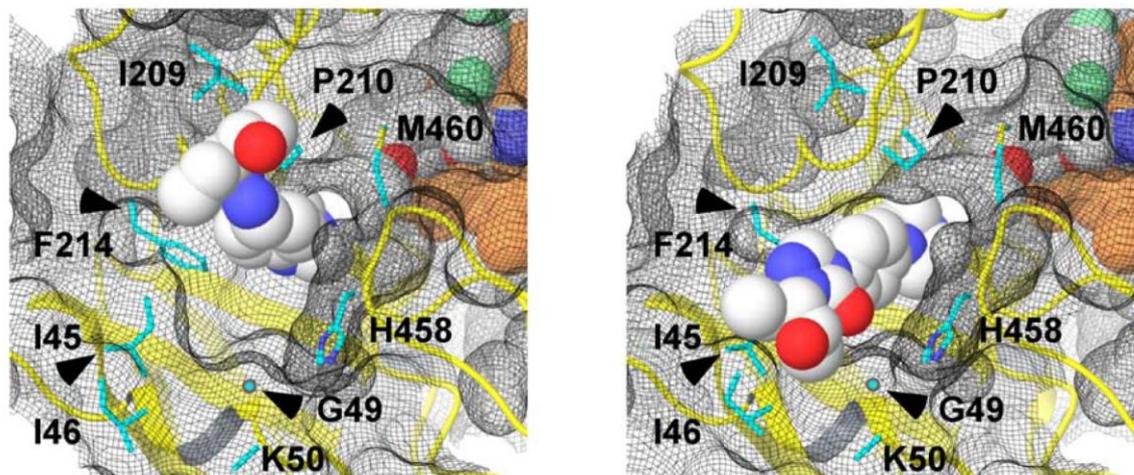


Figure 15 : Protrusion de la molécule de posaconazole à l'extérieur du tunnel hydrophobe de CYP51 (selon deux conformations de la molécule de posaconazole, gauche et droite). L'architecture de CYP51 est indiquée en jaune et la surface de la protéine par un maillage noir. Les acides aminés entourant l'entrée du tunnel sont indiqués. Les flèches correspondent aux acides aminés identifiés comme impliqués dans les mécanismes de résistance au posaconazole chez *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans*. La molécule de posaconazole est représentée sous forme de sphères avec les atomes de carbone en blanc, l'oxygène en rouge, l'azote en bleu, le fluor en vert. L'hème figure en orange. (Chen *et al.* 2010).

2.3 Immunopathologie de la THA

2.3.1 Introduction

La co-évolution de *T.b. gambiense* et *T.b. rhodesiense* avec leur hôte s'est accompagnée de l'élaboration de différents mécanismes d'échappement du parasite au système immunitaire de l'hôte. La persistance de l'infection et la moindre efficacité des défenses immunitaires de l'hôte rendent compte des phénomènes immunopathologiques observés au cours de l'évolution de l'infection. Dans de la trypanosomose, les principales lésions anatomopathologiques sont d'origine immunitaire. Ainsi, le Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), autrefois également appelé cachectine, est en grande partie responsable de la cachexie sommeilleuse, phase terminale de la THA (Okomo *et al.*, 1995)(Magez *et al.*, 1999).

La première étape de la réponse immunitaire d'un hôte repose sur l'immunité innée qui implique la reconnaissance de certains motifs moléculaires associés aux pathogènes (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs). Ceux-ci déclenchent une réponse pro-inflammatoire précoce des cellules macrophagiques et des DCs, suivie d'une réponse anti-inflammatoire. Cette seconde étape met en jeu l'activation de la réponse immunitaire réparatrice de l'hôte. La réponse lymphocytaire T présente dans la trypanosomose une forte polarisation Th1.

Différentes stratégies d'échappement du parasite visent à contourner la réponse immunitaire de l'hôte. Nous citons ces stratégies ci-dessous et nous détaillerons les plus importantes par la suite. Le phénomène de variation antigénique, par renouvellement de la VSG, constitue un mécanisme d'échappement majeur du parasite à la réponse immunitaire adaptative médiée par les lymphocytes B (Black *et al.* 2010)(Hall *et al.* 2013)(Pays *et al.* 2014). Un des premiers mécanismes lors de l'infection est la limitation de la production de TNF- α par les cellules myéloïdes grâce à l'activation d'adénylate cyclases du parasite lors de sa phagocytose (Salmon *et al.* 2012). Deux autres mécanismes jouent un rôle important : la résistance au sérum humain et les altérations de la fonction des CPA (DCs et macrophages). Ce dernier phénomène conduirait à une modulation de la réponse Th1 par les DCs (Pletinckx *et al.* 2011). Les protéines du sécrétome sont

impliquées dans certains mécanismes, telles l'altération de la maturation des DCs (Garzon *et al.* 2013) et l'induction de la voie de l'arginase macrophagique (Gobert *et al.* 2000)(Holzmuller *et al.*2008)(De Muylder *et al.* 2013). D'autres mécanismes d'échappement du parasite ont été décrits comme la sécrétion par le parasite du TLTF (*Trypanosome-derived Lymphocyte-Triggering Factor*) qui activerait la sécrétion d'interféron- γ (IFN- γ) par les lymphocytes T CD8. Cet IFN- γ lui-même stimulerait la croissance du parasite (Hamadien *et al.* 1999)(Hamadien *et al.* 2000). De plus, les trypanosomes échappent à la lyse induite par l'activation de la voie alterne du complément, notamment par une inhibition impliquant la VSG (Devine *et al.* 1986). Il existe en outre au cours de la trypanosomose une dérégulation cytokinique (Kato *et al.* 2016).

2.3.2 Rappels immunologiques

2.3.2.1 Lignées hématopoïétiques

Toutes les cellules sanguines dérivent d'un même progéniteur, la cellule souche pluripotente présente dans la moelle osseuse. En fonction de facteurs de croissance, de signaux et de l'environnement stromal, la cellule souche se différencie pour donner les progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes (Figure 16).

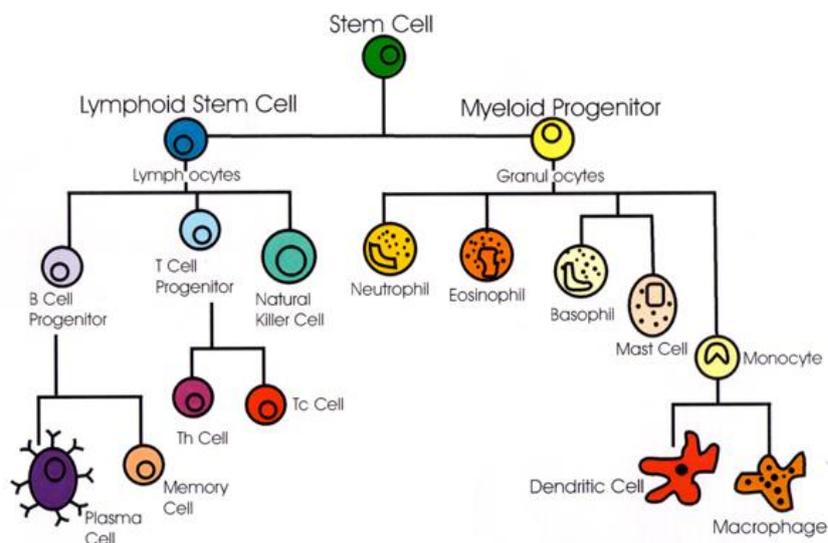


Figure 16 : lignée des cellules immunitaires (www.textbookofbacteriology.net)

Progéniteurs lymphoïdes

Les progéniteurs lymphoïdes poursuivent leur différenciation dans les organes lymphoïdes primaires, plus précisément le thymus pour la différenciation des lymphocytes T et la moelle osseuse pour la différenciation des lymphocytes B et des cellules NK. La maturation et le développement des lymphocytes T dans le thymus correspondent à l'acquisition de leur TCR (*T-cell receptor*) associé au CD3, au CD4 ou au CD8, et de la tolérance au soi. Le développement des lymphocytes B se fait au niveau de la moelle osseuse à partir de la lignée lymphoïde. La maturation et le développement des lymphocytes B correspondent à l'acquisition du BCR (*B-cell receptor*) et à l'acquisition de la tolérance au soi. Les lymphocytes T et B gagnent la circulation lymphatique et sanguine pour se loger dans les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglions et organes lymphoïdes associés aux muqueuses). Les lymphocytes recirculent également dans l'organisme.

Les lymphocytes T sont habituellement divisés en deux grands sous-ensembles qui sont fonctionnellement et phénotypiquement différents. La sous-population T auxiliaire, aussi appelée T CD4, est un coordinateur de la régulation immunitaire. L'autre type important de lymphocyte T est appelé cellule T cytotoxique ou T CD8. Ces cellules jouent un rôle essentiel en détruisant directement certaines cellules tumorales, les cellules infectées par des virus et parfois des parasites.

Progéniteurs myéloïdes

Les progéniteurs myéloïdes sont à l'origine des érythrocytes, des mégacaryocytes qui évoluent en plaquettes, des polynucléaires (basophile, éosinophile et neutrophile) et des monocytes. Les monocytes nous intéressent particulièrement du fait de leurs précurseurs communs avec certaines DCs. Ils sont libérés vers le sang où ils ont une demi-vie d'environ 2 à 3 jours. Sous l'influence de facteurs chimio-attractants, les monocytes circulants migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages dont il existe différentes populations. Il faut distinguer les macrophages dérivés des monocytes sanguins dans un contexte inflammatoire (cellules activées), des macrophages résidents participant à l'homéostasie dans les tissus. Certains macrophages ont des capacités qui leur sont propres tout en conservant des propriétés communes, comme la capacité de

produire de grandes quantités de médiateurs de l'inflammation et, notamment, des cytokines pro-inflammatoires. Les DCs myéloïdes, importantes dans la trypanosomose, feront l'objet d'un paragraphe séparé.

2.3.2.2 Les cellules dendritiques (DCs)

Les DCs sont des CPA impliquées à la fois dans la reconnaissance initiale des pathogènes et dans la réponse cellulaire et humorale spécifique. Elles sont plus efficaces que les macrophages pour la présentation d'antigènes et sont les principales cellules à l'origine de la polarisation de la réponse lymphocytaire T CD4. Les DCs ont été décrites initialement à partir de préparations de splénocytes comme un type cellulaire unique présentant une morphologie stellaire (Steinman *et al.* 1973). Aujourd'hui, différentes sous-populations ont été identifiées (Puhr *et al.* 2015). Du fait de leur faible proportion dans l'organisme (environ 1% des leucocytes totaux), les premières caractérisations ont été délicates (Hart *et al.* 1997). Cependant, le développement de techniques de différenciation en DCs *in vitro*, à partir de monocytes ou de cellules souches CD34+, a permis de faciliter leur étude (Sallustro *et al.* 1994). Les DCs classiques se distinguent par leur capacité à stimuler les lymphocytes T naïfs et par leurs différences biochimiques avec les macrophages. Il n'existe pas de marqueur spécifique de la lignée dendritique. Les sous-populations de DCs sont classées selon leur localisation et l'expression différentielle de plusieurs marqueurs de surface. Quatre principaux types de DCs peuvent ainsi être schématiquement décrits : les DCs classiques ou conventionnelles, les DCs plasmacytoïdes, les cellules de Langerhans et les DCs dérivées des monocytes (Satpathy *et al.* 2012).

Reconnaissance des pathogènes

La détection des pathogènes microbiens par les cellules du système immunitaire inné repose sur la liaison de motifs PAMPs. Ceux-ci peuvent être des lipopolysaccharides de bactéries Gram négatives, des peptidoglycanes de bactéries Gram positives, des motifs d'ADN CpG (« Cytosine-phosphate-Guanine », séquence de bases nucléiques CG) non méthylés ou encore des ARN double brin de virus. Ces motifs, très conservés, sont reconnus par les PRRs (récepteurs de reconnaissance de profil moléculaire, *Pattern Recognition Receptors*). Ces derniers

peuvent être exprimés à la surface de la cellule comme les *Toll Like Receptors* (TLRs), certaines lectines de type C, les récepteurs *scavenger* ou dans le cytosol comme les récepteurs NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). Du fait de leur présence dans de nombreux tissus et de leur capacité à capturer les antigènes qu'elles rencontrent, les DCs sont parfois appelées cellules sentinelles. Lorsque la DC perçoit des signaux de danger (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs), la capture antigénique va induire l'activation d'un processus de maturation. La DC va alors exprimer des molécules de maturation et de co-stimulation, migrer vers les organes lymphoïdes secondaires, présenter des peptides issus de ces antigènes aux lymphocytes T naïfs et les activer, initiant ainsi la réponse immunitaire adaptative.

Capture et apprêtement des antigènes par les DCs

La DC immature peut capturer les antigènes solubles ou liés à des récepteurs par macropinocytose, micropinocytose, phagocytose ou endocytose. Les récepteurs *scavenger*, les récepteurs Fc et les lectines de type C comme le récepteur au mannose (CD206) ou le DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*, CD209) interviennent dans le mécanisme par endocytose. Le DC-SIGN présente des fonctions supplémentaires car il est impliqué dans la migration trans-endothéliale des DCs, il interagit avec les voies de signalisation des TLR et il régule également le signal de prolifération des lymphocytes T induit par les DCs. Une fois internalisé par la DC, l'antigène va être fragmenté en peptides et présenté par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II, respectivement selon son origine endogène ou exogène. De plus, les DCs sont les seules cellules capables de présenter des antigènes exogènes par le CMH de classe I : c'est le phénomène de présentation croisée. Ce phénomène permet aux DCs d'engendrer une réponse immunitaire cytotoxique contre un virus ou un parasite sans que ces cellules ne soient infectées (Heath *et al.* 2004).

Maturation des DCs

La maturation des DCs est une étape fondamentale pour l'induction de la réponse immunitaire. Les DCs présentent lors de leur maturation des modifications morphologiques et fonctionnelles : expression *de novo* de molécules de co-

stimulation et capacité à activer les lymphocytes T naïfs. La modification de leur morphologie correspond à l'acquisition d'une forme en étoile avec de longs prolongements cytoplasmiques appelés « dendrites ». Lors de la maturation, les DCs perdent leur capacité d'endocytose mais expriment de nouvelles molécules d'adhésion ainsi que des molécules leur permettant d'interagir avec les lymphocytes T tels CD80, CD86, ICOS-L (*CD28-like receptor Inducible Costimulatory Ligand*, CD275) et OX40L (*OX40 Ligand*, CD252) (Banchereau *et al.* 1998)(Reis a Sousa 2006)(Sukhbaatar *et al.* 2016). Les molécules du CMH de classe II, qui avaient une demi-vie courte et étaient rapidement internalisées dans les DCs immatures, sont exprimées en association avec un peptide antigénique de façon stable à la surface, permettant leur interaction avec un lymphocyte. De plus, lors du processus de maturation, les DCs acquièrent la capacité de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires.

Activation et polarisation des lymphocytes T par les DCs

Les lymphocytes T naïfs arrivent par la circulation sanguine dans les organes lymphoïdes secondaires. Dans ces organes lymphoïdes, la DC mature présente le complexe CMH/peptide aux lymphocytes T naïfs. Plusieurs signaux doivent être présents pour une activation complète du lymphocyte. Le premier correspond à l'engagement du TCR exprimé par le lymphocyte T avec le complexe CMH/peptide antigénique de la DC. Ce premier signal est renforcé par les co-récepteurs CD4 ou CD8 (Grakoui *et al.* 1999). Le deuxième signal ou signal de co-stimulation correspond à l'engagement spécifique de différentes molécules membranaires exprimées à la surface du lymphocyte et de la DC. La zone d'interaction stable entre la DC et le lymphocyte T est appelée « synapse immunologique » (Bustos-Morán *et al.* 2016). Les molécules CD80 et CD86 interagissent avec la molécule CD28 exprimée constitutivement par le lymphocyte T. Il s'agit de la voie majeure de co-stimulation du lymphocyte. Le CD40 exprimé par les DCs se fixe à son ligand CD40-L (CD154) présent sur le lymphocyte T activé. Cette voie augmente l'activation des cellules T par une boucle de rétrocontrôle positif, qui rend les CPA meilleures stimulatrices grâce à l'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulation CD80, CD86 et la synthèse d'IL-12 par les DCs. La liaison de CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), exprimé par les lymphocytes T activés, à CD80 et CD86 induit des fonctions inhibitrices. L'engagement de PD-1

(*Programmed cell Death-1*), exprimé par les lymphocytes T activés, à PD-L1 ou à PD-L2 (*Programmed cell Death Ligand 1 ou 2*) induit également une action inhibitrice aboutissant à un arrêt de la prolifération lymphocytaire (Liechtenstein *et al.* 2012). La reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte CD4 induit l'activation du lymphocyte par une série de processus aboutissant à l'expression du récepteur IL-2R (CD25) et à la production de la cytokine IL-2. Celle-ci se fixe sur son récepteur pour engendrer l'expansion clonale suivie d'une différenciation en lymphocyte T CD4 effecteur et lymphocyte T CD4 mémoire. Un troisième signal oriente la polarisation des cellules T CD4 en différents profils de lymphocytes (par exemple Th1/Th2/Th17 ou Treg) (Figure 17). En effet, historiquement, Mosmann *et al.* ont montré que les clones de lymphocytes T CD4 murins pouvaient être divisés en deux groupes (Th1 ou Th2) suivant leur profil de sécrétion de cytokines (Mosmann *et al.* 1986)(Mosmann *et al.* 1987). Par la suite, d'autres phénotypes ont été décrits : Treg et Th17 (Kapsenberg *et al.* 2003). Les phénotypes Th9, Th22 et Tfh (*follicular helper*) ont été identifiés plus récemment (Zhu *et al.* 2010)(Ma *et al.* 2016)(Zeng *et al.* 2016). Nous ne détaillerons pas ici les mécanismes et la fonction de la polarisation lymphocytaire.

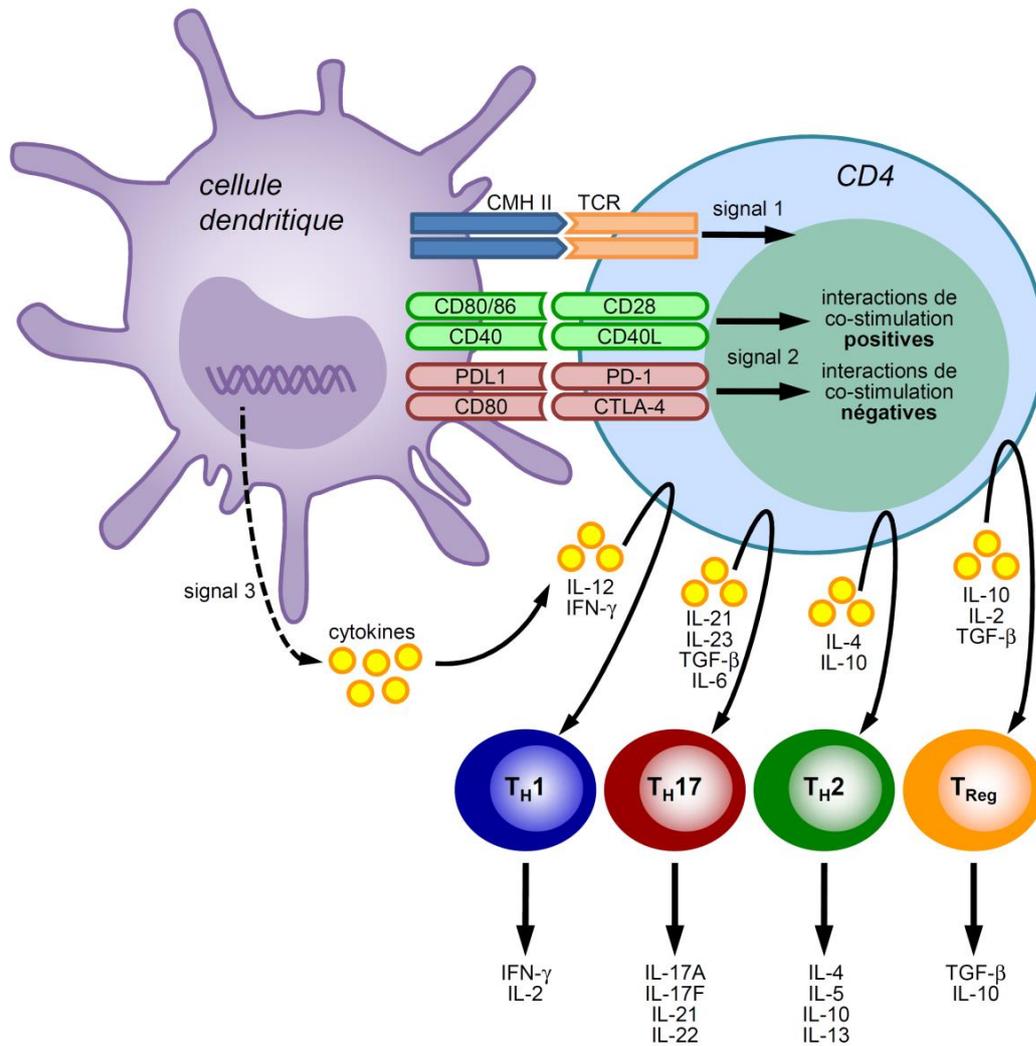


Figure 17 : Activation et orientation de la réponse lymphocytaire T CD4+ par les DCs (d'après Liechtenstein *et al.* 2012).

Voies de signalisation dans les DCs

L'engagement des ligands des TLR et du récepteur au TNF- α induit la maturation des DCs par l'activation de nombreuses molécules de transduction impliquées dans différentes voies de signalisation. La transduction par les TLR aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels le NF- κ B (*nuclear factor-kappa B*) ou les IRFs (*Interferon Regulatory Factors*) (Figure 18). NF- κ B régule l'expression de gènes importants pour l'activation des lymphocytes T par les DCs (CD40, IL-12, IL-6) ainsi que l'expression des gènes codant des cytokines inflammatoires tels le TNF- α , l'IL-1- α et l'IL-6. Cependant, l'activation d'autres

molécules spécifiques par ces TLR est à l'origine de l'orientation vers une réponse Th1 ou Th2. La molécule adaptatrice MyD88 (*myeloid differentiation primary response protein 88*) y joue un rôle important, hormis pour le TLR3 qui ne se lie pas à MyD88. MyD88 interagit avec la voie du NF- κ B, des MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*; p38MAPK, JNK, ERK) et de la PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*). La voie p38MAPK joue un rôle crucial dans la maturation des DCs par le LPS ou par le TNF- α . Son activation participe à l'expression à la surface du CMH de classe II, des molécules de co-stimulation (CD40, CD80, CD86) et de maturation CD83. Elle est aussi impliquée dans la sécrétion de cytokines inflammatoires tels l'IL-12p40, l'IL-12p70 et le TNF- α . La voie PI3K semble réguler négativement la réponse engendrée par les ligands de TLR. Elle module l'activation de NF- κ B et semble aussi pouvoir inhiber la voie p38MAPK bloquant ainsi la transcription de gènes dont celui de l'IL-12.

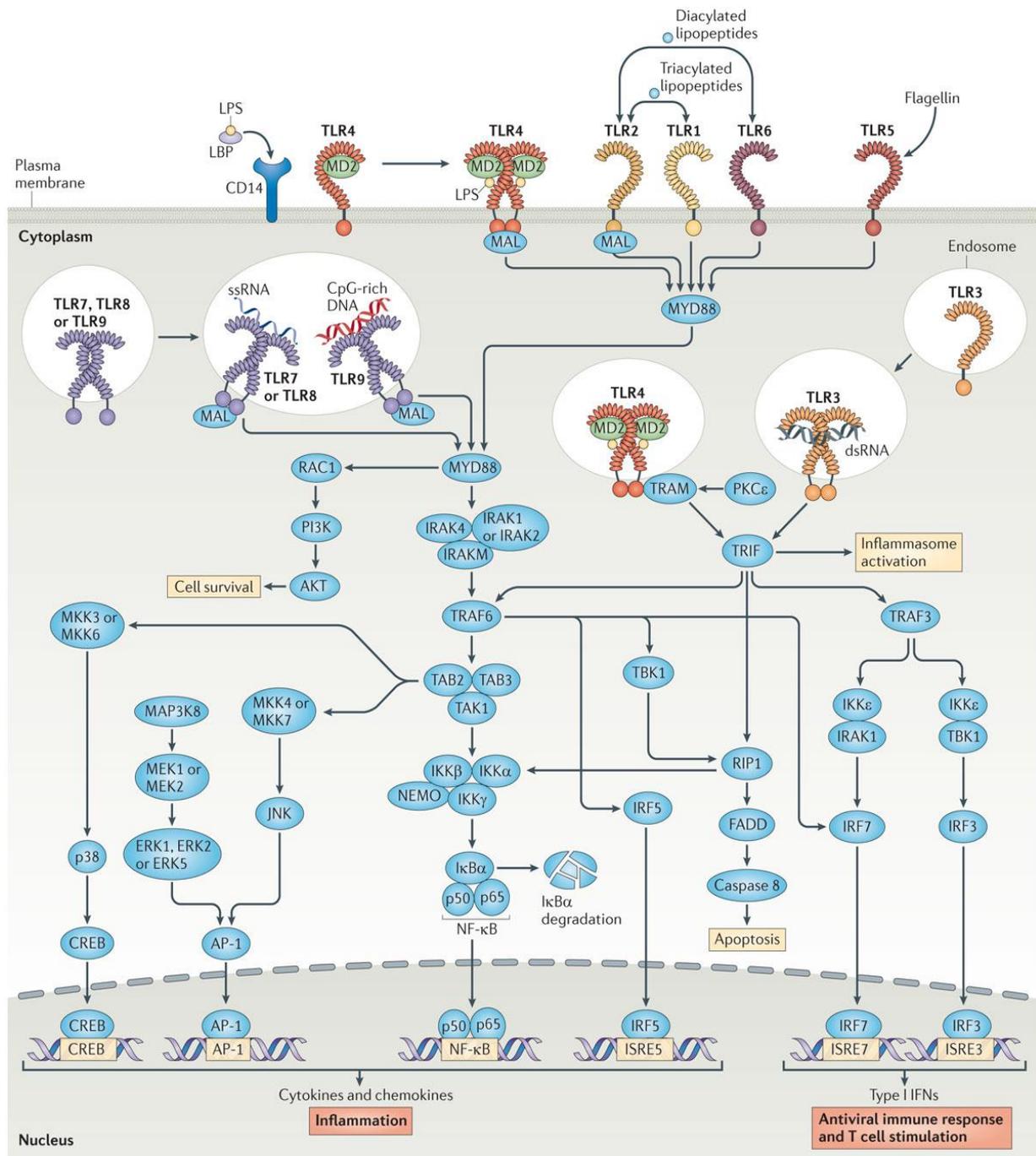


Figure 18 : Voies de signalisation des TLRs.

Abbreviations : AP-1 : *activator protein 1* ; CREB : *cAMP-responsive element-binding protein* ; ERK : *extracellular signal-regulated kinase* ; FADD : *FAS-associated death domain* ; IRAK : *interleukin-1 receptor-associated kinase* ; IRF : *IFN-regulatory factor* ; JNK : *JUN N-terminal kinase* ; MAL : *MYD88 adaptor-like protein* ; MAP3K : *mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8* ; MD2 : *myeloid differentiation factor 2* ; MEK : *mitogen-activated protein kinase/ERK kinase* ; MKK : *mitogen-activated protein kinase kinase* ; NEMO : *NF-κB essential modulator* ; NF-κB : *nuclear factor-κB* ; PI3K : *phosphoinositide 3-kinase* ; TAB : *TAK1-binding protein* ; TAK1 : *TGFβ-activated kinase 1 (MAP3K7)* ; TBK1 : *TANK-binding kinase 1* ; TRAF : *tumour necrosis factor receptor-associated factor* ; TRAM : *TRIF-related adaptor molecule*. (Gay et al. 2014).

Les lectines forment une famille hétérogène de récepteurs qui reconnaissent certaines structures oligosaccharidiques et jouent un rôle majeur dans les processus d'interactions entre les cellules. La fonction des lectines de type C dépend du calcium. Les lectines de type C ont un rôle dans la modulation des voies de signalisation activées par les TLR et dans l'orientation de la réponse lymphocytaire (Geijtenbeek *et al.* 2016). Le récepteur au mannose (CD206) contribue à orienter la réponse Th17 dans les infections fongiques mais favorise la réponse Th2 en présence de différents allergènes par une diminution de la production d'IL12p70 induite par les TLR. La Dectine 1 (CD369) est également impliquée dans la modulation de la réponse Th17 dans les infections fongiques. L'activation du DC-SIGN par les hydrates de carbone n'induit pas par lui-même l'expression de cytokines mais module les voies de signalisation induites par les autres PRRs. De nombreux agents intra-cellulaires comme les mycobactéries et les virus se lient au DC-SIGN *via* des motifs mannose, alors que certains agents extra-cellulaires comme les parasites ou *Helicobacter pylori* se lient *via* des motifs fucose. La liaison *via* des motifs mannose active des voies de signalisation pro-inflammatoires. Au contraire, la reconnaissance de motifs fucose par le DC-SIGN favorise la réponse adaptative de type Th2 et Tfh (Figure 19) (Geijtenbeek *et al.* 2016). Dans les macrophages, en réponse aux ligands fucose, le DC-SIGN est à l'origine d'une augmentation de l'expression de l'IL-10 résultant en une orientation Treg. MINCLE (*Macrophage-inducible C-type lectin receptor*) est une autre lectine de type C dont le rôle a été identifié dans la reconnaissance des mycobactéries par les macrophages. Il se lie spécifiquement aux structures α -mannosylées. Dans les DCs, MINCLE active la voie PI3K, ce qui diminue la production d'IL-12p70 et favorise l'orientation Th2.

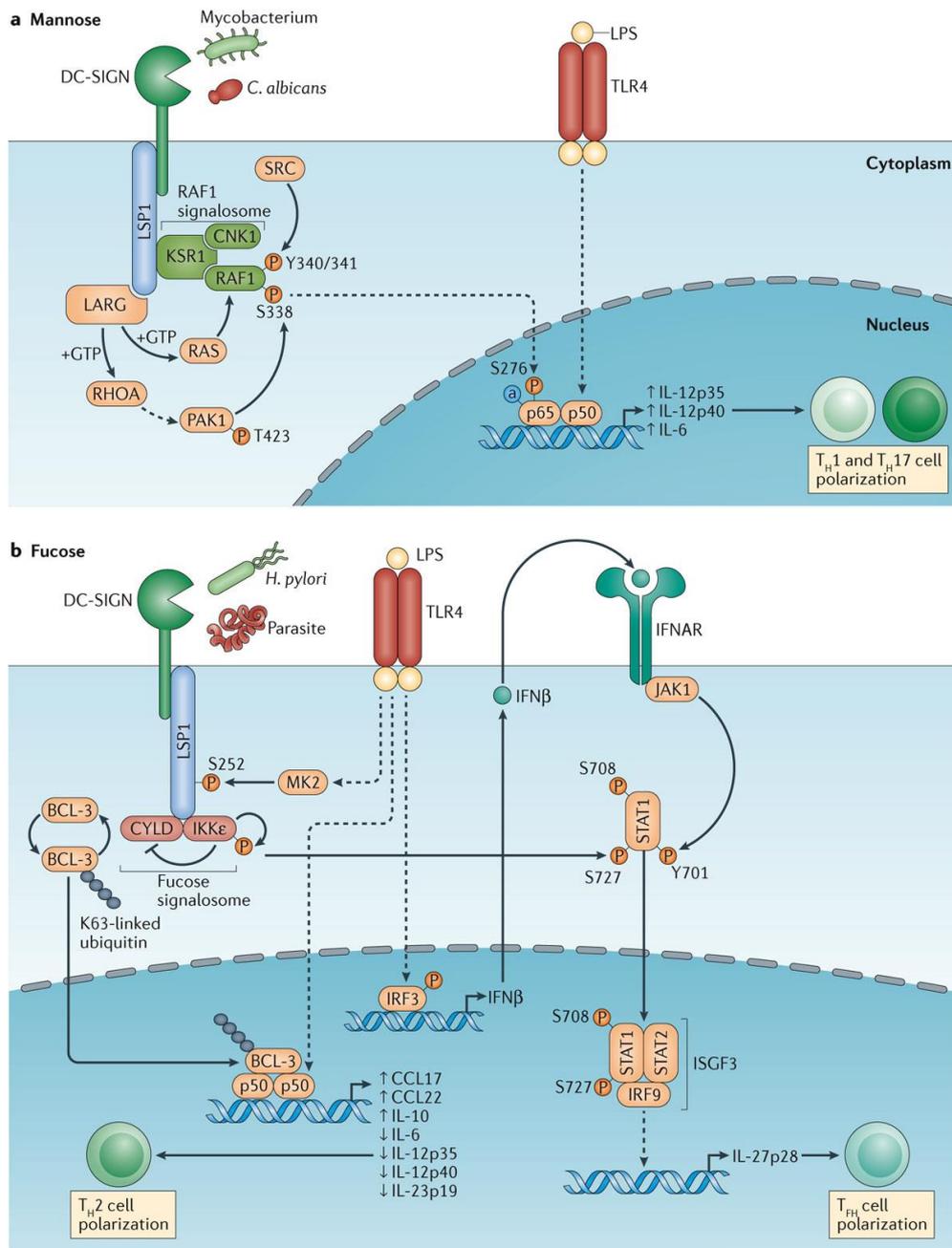


Figure 19 : rôle du DC-SIGN (Geijtenbeek *et al.* 2016).

La cytométrie en flux

La technique de choix pour l'analyse des DCs, comme pour les autres cellules immunitaires, est la cytométrie en flux. Cette technique permet l'analyse simultanée qualitative et quantitative de multiples paramètres à l'échelon cellulaire dans une population hétérogène en suspension dans un liquide.

Un cytomètre en flux est composé de trois systèmes : le système fluïdique qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire au point d'interrogation, le système optique comprenant des lasers comme source de lumière et des filtres optiques qui séparent la lumière émise par la cellule et la dirigent vers les détecteurs, et enfin le système électronique qui va convertir la lumière en signaux électroniques analysables par l'ordinateur (Figure 20).

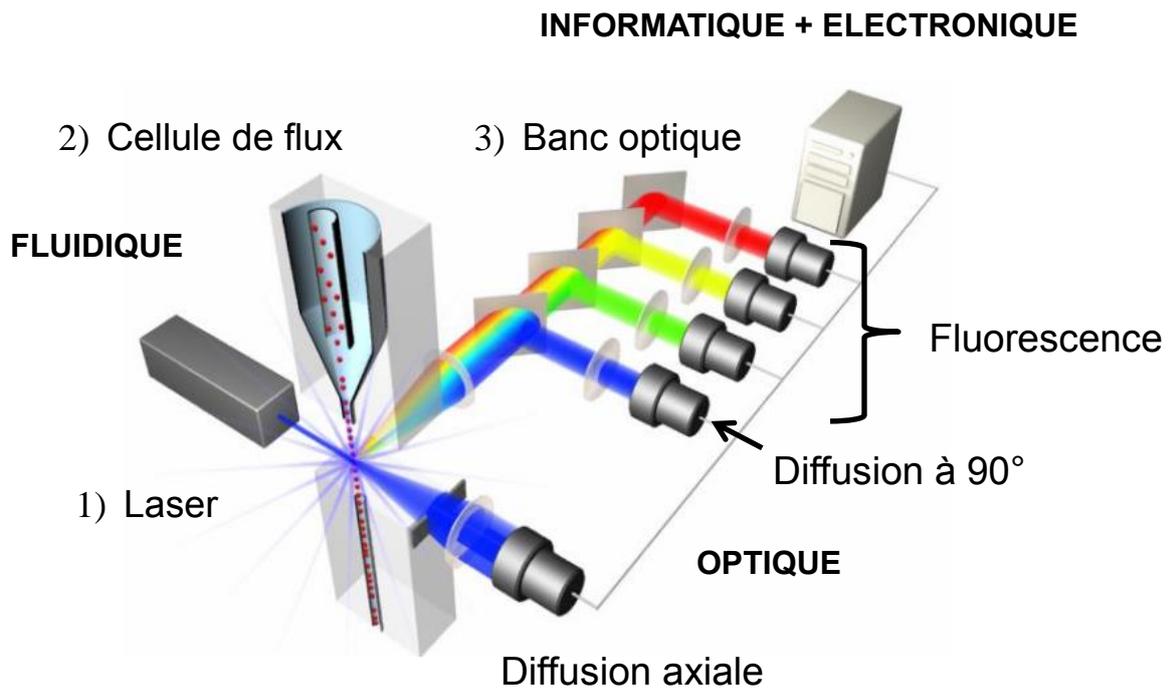


Figure 20 : Composants majeurs d'un cytomètre en flux.

Les données recueillies par le cytomètre en flux sur la cellule sont sa taille relative (FSC), sa granularité relative (SSC) et son intensité relative de fluorescence (Recktenwald *et al.* 1993)(Brown *et al.* 2000). Cette dernière donnée correspond généralement à des propriétés liées à des marquages spécifiques, généralement des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. La collecte des données est aidée par des logiciels qui permettent, par exemple, l'usage d'une stratégie d'analyse hiérarchique de l'échantillon (*gating strategy*). Les représentations graphiques obtenues sont des histogrammes monoparamétriques (intensité de signal et nombre de cellules) ou biparamétriques (deux signaux présentés simultanément) (Figure 21).

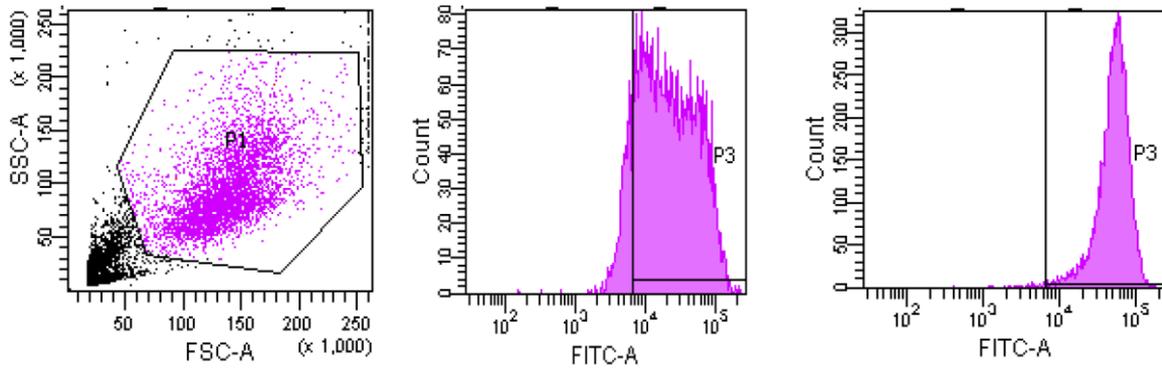


Figure 21 : Exemple de marquage de DCs en culture avec un anticorps anti-HLA-DR couplé au FITC. La population est repérée sur les critères de sa taille relative (FSC) et de sa granularité relative (SSC) à gauche. L'intensité de signal du marquage HLA-DR est représentée sur les histogrammes avant et après stimulation par le LPS (respectivement histogrammes au milieu et à droite). L'étape intermédiaire d'exclusion des cellules non vivantes par l'iodure de propidium n'est pas représentée.

Les DCs représentent environ 1% des cellules immunitaires et sont donc en très petit nombre dans le sang circulant. Chez l'humain, certains auteurs ont cherché à les identifier dans le sang en cytométrie en flux sur la base des critères FSC et SSC (intermédiaire entre les monocytes et les lymphocytes) et comme exprimant HLA-DR et négatives pour les lignées (CD3+CD14+CD20+CD56) et pour CD34. Parmi ces DCs, il est possible d'identifier les DCs plasmacytoïdes CD123+, et trois sous-populations de DCs myéloïdes CD11c+, exprimant CD16, CD1c (BDCA-1, *blood dendritic cell antigen-1*) ou CD141 (BDCA-3, *blood dendritic cell antigen-3*) (Autissier *et al.* 2010).

2.3.3 Immunopathologie

2.3.3.1 *Résistance des trypanosomes au sérum humain*

Les humains possèdent une immunité innée spécifique vis-à-vis de *T. brucei*. Ce système de lyse des trypanosomes est également présent chez d'autres primates comme les gorilles et les babouins, et résulterait de la coexistence des ancêtres primates des humains avec les trypanosomes en Afrique. *T.b. gambiense* et *T.b. rhodesiense* peuvent échapper à cette immunité innée (Pays *et al.* 2014).

Facteurs de lyse des trypanosomes

Les facteurs de lyse des trypanosomes (*Trypanosome Lytic Factor*, TLF) correspondent à deux complexes différents du sérum humain. TLF1 est la fraction la plus dense des HDL (*High Density Lipoprotein*) qui contiennent un noyau lipidique entouré d'une membrane externe constituée de phospholipides, de cholestérol et de plusieurs apolipoprotéines. La principale de ces apolipoprotéines est l'apolipoprotéine (Apo) A1. TLF2 correspond à d'autres complexes sériques pauvres en lipides et contenant des immunoglobulines de type IgM, ainsi que l'ApoA1 et d'autres protéines. TLF1 et TLF2 contiennent tous deux les protéines HPR (*Haptoglobin-Related Protein*) et l'ApoL1. HPR est impliquée dans le ciblage du parasite et ApoL1 joue le rôle de toxine trypanolytique (Drain *et al.* 2001)(Vanhollebeke *et al.* 2007)(Molina-Portela *et al.* 2008).

HPR permet l'internalisation de TLF1 dans le parasite sous la forme d'un complexe lié à l'hémoglobine reconnu par un récepteur du trypanosome (*T. brucei surface receptor for haptoglobin-haemoglobin*, TbHpHbR) (Vanhollebeke *et al.* 2008). L'endocytose médiée par ce récepteur se déroule au niveau de la poche flagellaire du parasite. Le mécanisme d'entrée du TLF2 est incomplètement connu et pourrait impliquer en partie HPR. Il a également été émis l'hypothèse d'un mécanisme d'entrée par liaison des IgM du TLF2 avec des résidus mannose portés par la VSG (D'Hondt *et al.* 1979)(Drain *et al.* 2001).

L'activité trypanolytique des TLF1 et TLF2 est réalisée par l'ApoL1. Le domaine N-terminal de l'ApoL1 présente une similarité avec les domaines impliqués

dans la formation des pores membranaires par les toxines bactériennes de type colicines (Pérez-Morga *et al.* 2005). Chez les trypanosomes, ApoL1 est relarguée du complexe TLF, s'insère dans la membrane des endosomes et est à l'origine de la lyse du parasite par des mécanismes osmotiques dus à la formation des pores ioniques. Le mécanisme de la lyse des trypanosomes pourrait aussi résulter de l'activation de voies de signalisations induites par la perméabilisation de la membrane lysosomiale et engageant un mécanisme de mort par apoptose (Boya *et al.* 2008).

Mécanismes de résistance des trypanosomes aux TLF

La résistance de *T.b. rhodesiense* au sérum humain est liée à l'expression de la protéine SRA (Xong *et al.* 1998). Son expression résulte de l'activation d'un site associé à celui codant pour une VSG (*Expression Site-Associated Gene, ESAG*). SRA est adressée au compartiment lysosomal où elle se lie à l'ApoL1 (Vanhamme *et al.* 2003). L'interaction directe des deux protéines inhibe l'activité de formation de pores de l'ApoL1 (Figure 22).

La résistance de *T.b. gambiense* est liée en partie à l'expression de la protéine TgsGP (Berberof *et al.* 2001)(Uzureau *et al.* 2013)(Capewell *et al.* 2013). TgsGP induit une rigidification de la membrane de l'endosome. Ce phénomène permettrait un ralentissement de l'insertion de l'ApoL1 dans la membrane et sa dégradation par des protéases du lysosome du parasite. Cette dégradation est favorisée par une acidification plus précoce au sein des endosomes. De plus, la résistance de *T.b. gambiense* serait également favorisée par une diminution de l'endocytose de TLF1 grâce à une mutation du gène codant pour TbHpHbR (Kieft *et al.* 2010)(Dejesus *et al.* 2013) (Figure 22).

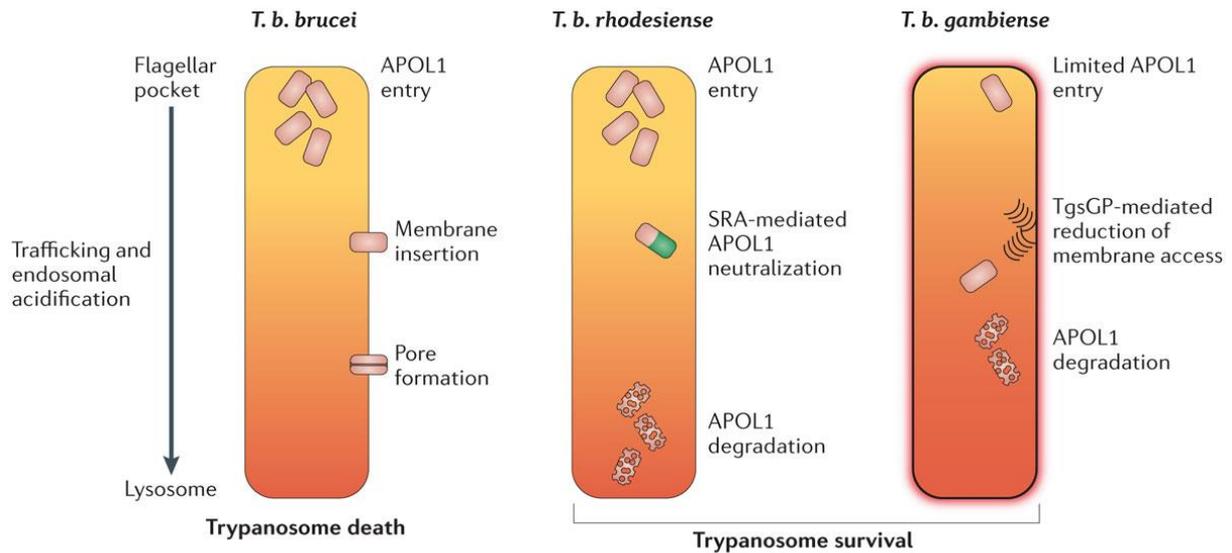


Figure 22 : Mécanisme d'action de l'ApoL1 chez les trois sous-espèces de *T. brucei*. Chez *T. b. rhodesiense*, la protéine SRA interagit avec l'ApoL1 et empêche la formation de pores dans la membrane. Ces protéines sont alors dégradées par les protéases. Chez *T. b. gambiense*, la protéine TgsGP prévient l'insertion de l'ApoL1 grâce à une interaction avec des composés lipidiques de la membrane provoquant sa rigidification. L'inactivation du récepteur TbHpHbR et l'acidification plus précoce dans les endosomes (représentée dans la figure par le gradient d'intensité de la couleur orange) contribuent au mécanisme de résistance. (Pays *et al.* 2014)

2.3.3.2 Modulation de la fonction des cellules présentatrices d'antigènes

Reconnaissance du pathogène

La première étape de la réponse immunitaire d'un hôte repose sur l'immunité innée qui implique la reconnaissance des motifs PAMPs. Il a été montré dans la trypanosomose que les résidus GPI qui lient les molécules de VSG à la membrane sont clivés par l'activation d'une phospholipase-C du parasite et constituent des motifs reconnus par les CPA. Ces motifs sont ainsi exposés et reconnus par des récepteurs SR-A (*Type A Scavenger Receptors*) présents à la surface des DCs et des macrophages (Magez *et al.* 1998). Ces cellules présentent en réponse dans un premier temps un profil d'activation pro-inflammatoire classique avec production de molécules trypanocides (TNF- α et dérivés réactifs de l'oxygène), de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12 et IFN- γ) et des modifications fonctionnelles (dont l'augmentation d'expression du CMH de classe II et de molécules de costimulation

nécessaires à la présentation d'antigènes). Après liaison, la reconnaissance de l'antigène induit une cascade intra-cellulaire qui conduit à l'activation de NF- κ B, de la voie des MAPK et l'expression de gènes pro-inflammatoires. Dans l'infection à *T. cruzi*, il a été montré que les résidus GPI peuvent activer les TLR2, TLR6 et TLR4 (Campos *et al.* 2001). L'usage de l'ARNi pour diminuer l'expression de différents TLRs de macrophages a également permis de mettre en évidence expérimentalement l'activation du TLR2 dans l'infection à *Leishmania donovani* (Flandin *et al.* 2006). Dans la trypanosomose, les données sont limitées mais il a été suggéré un rôle du TLR2 et du TLR3 dans le contrôle de l'infection cérébrale (Amin *et al.* 2012). Des motifs non GPI sont également impliqués dans la reconnaissance des protozoaires. Les motifs d'ADN CpG de *T. cruzi* et *T. brucei* sont impliqués dans la reconnaissance de ces pathogènes par le TLR9 et dans la réponse inflammatoire protectrice de l'hôte (Paulnock *et al.* 2010)(Khan *et al.* 2014)(Rodrigues *et al.* 2012) (Figure 23).

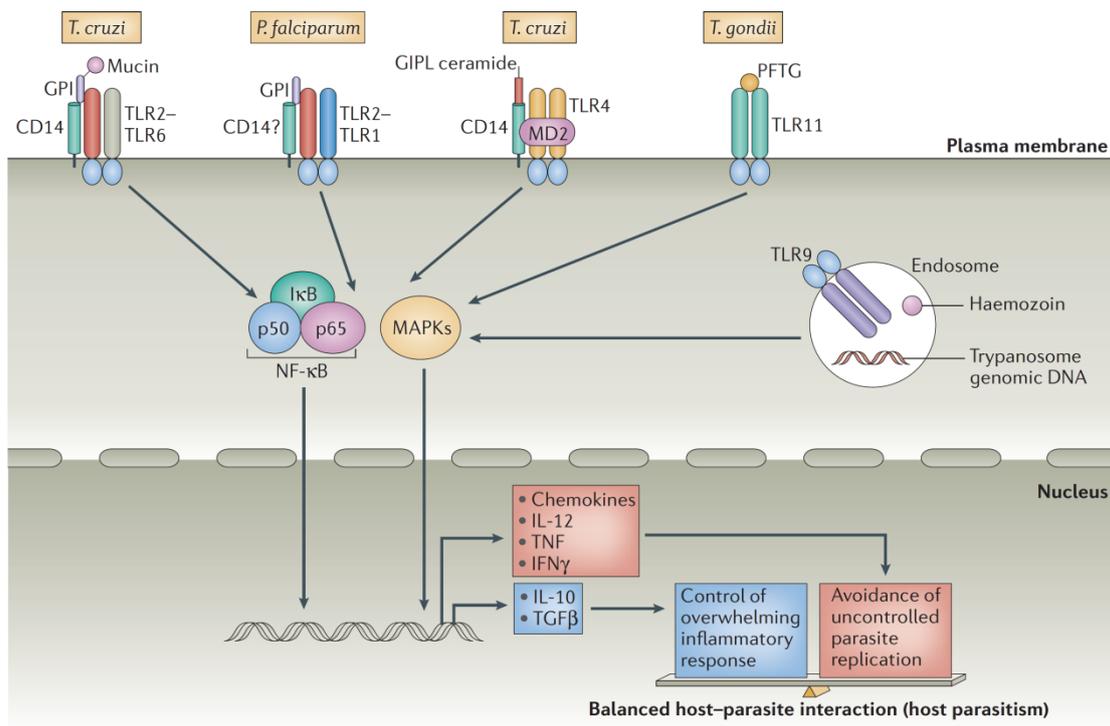


Figure 23 : Activation des TLRs par les PAMPs de différents protozoaires (Gazzinelli *et al.* 2006).

Altération de la maturation des DCs

Les DCs sont les principales cellules impliquées dans l'activation de la réponse lymphocytaire Th1 dirigée contre la VSG au cours de la THA (Dagenais *et al.* 2009). Dagenais *et al.* ont cependant observé que les DCs de souris infectées avec le clone virulent *T.b. rhodesiense* LouTat 1.5 ne stimulent pas efficacement une lignée clonale de lymphocytes T VSG-spécifique. Les DCs murines présentent en effet rapidement au cours de la trypanosomose des anomalies fonctionnelles de la présentation des antigènes à l'origine d'une diminution de la production de cytokines par les lymphocytes en co-culture (Garzón *et al.* 2013). De même, il a été mis en évidence que la capacité de présentation des antigènes par les macrophages murins est amoindrie en raison d'une réduction de l'expression des complexes CMH II-peptide antigénique à leur surface, bien que ces macrophages aient une fonction de capture des antigènes et d'expression du CMH II préservée. Ils présentent également une diminution de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86, ainsi que CD40 (Namangala *et al.* 2000). La moindre efficacité des CPA à présenter de nouveaux peptides antigéniques lors des vagues successives de parasitémie pourrait contribuer à empêcher le contrôle de l'infection.

Modulation des signaux pro-inflammatoires

Les voies de signalisation pro-inflammatoires pourraient être influencées par différents facteurs. La réponse pro-inflammatoire peut être modulée par MyD88, les TLR et les lectines de type C. Le rôle de l'adaptateur MyD88 dans la réponse protectrice des CPA a été montré dans la trypanosomose (Drennan *et al.* 2005)(Pletincks *et al.* 2011), de même qu'au cours de l'infection par *T. cruzi* et par *Plasmodium falciparum* (Campos *et al.* 2004)(Krishnegowda *et al.* 2005). Différents protozoaires sont capables de moduler les voies d'activation des TLRs. *Leishmania mexicana* diminue la production d'IL-12 par les macrophages, grâce à des peptidases qui limitent l'activation de NF- κ B (Cameron *et al.* 2004). L'hémozoïne produite lors de l'infection par *Plasmodium chabaudi* module l'activation des DCs par le TLR9 ainsi que leur capacité à activer les lymphocytes T (Millington *et al.* 2006). Au cours de la trypanosomose, la signalisation du TLR9 pourrait être modulée par le relargage de motifs d'ADN CpG à partir de trypanosomes sénescents ou endommagés (Paulnock *et al.* 2010). Le rôle de modulation des lectines de type C a été montré dans la leishmaniose, notamment avec un

homologue du DC-SIGN, SIGN-R3 (*Specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin receptor 3*, CD209D) via la modulation de la production de leucotriène (Lefèvre *et al.* 2013) (Figure 24). Il existe cependant des différences entre les systèmes immunitaires innés de l'Homme et de la souris, ce qui doit amener à interpréter les résultats de la littérature avec précaution. Par exemple, les TLR 11 et 12, qui sont importants dans la reconnaissance de *Toxoplasma gondii* chez la souris, ne sont pas exprimés chez l'Homme (Sher *et al.* 2015).

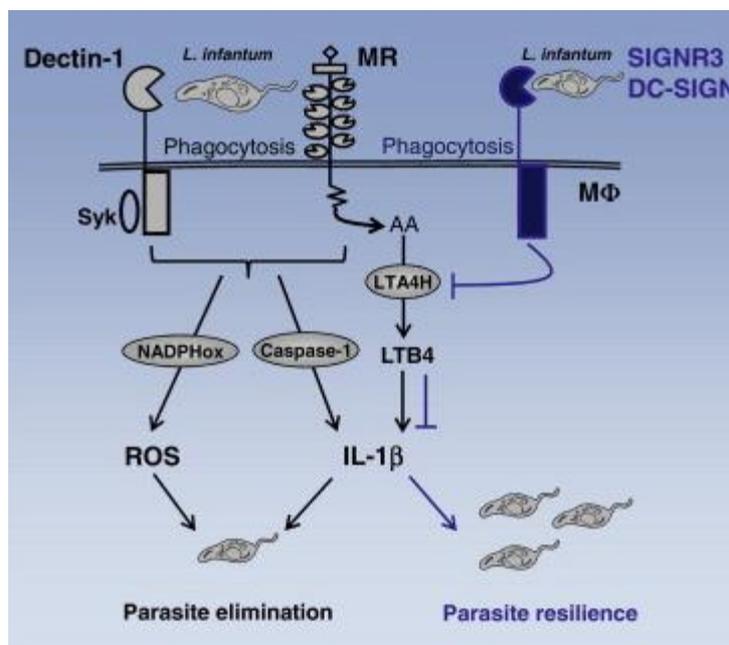


Figure 24 : Implication de SIGN-R3, du récepteur au mannose (MR) et de dectine-1 dans la leishmaniose. Abréviations : ROS : espèces réactives de l'oxygène, NADPHox : NADPH oxydase, AA : acide arachidonique, LTB4 : leucotriène B4 (Lefèvre *et al.* 2013).

La séquence et le niveau d'exposition des CPA à l'IFN- γ influencent également leur réponse inflammatoire dans la trypanosomose. La réponse pro-inflammatoire initiale des CPA peut être amplifiée expérimentalement par l'ajout d'IFN- γ avant ou pendant la mise en présence des PAMPs du parasite (Magez *et al.* 1998). La production d'IFN- γ est impliquée dans le phénomène de trypanotolérance (Ilboudo *et al.* 2016). Cependant, la pré-exposition de cellules macrophagiques à des résidus GIP-sVSG induit une diminution de la réponse à

l'IFN- γ (Coller *et al.* 2003). Ce phénomène serait lié à une inhibition de la phosphorylation de STAT1, laquelle est requise pour l'activation de la voie de signalisation du récepteur de l'IFN- γ . L'exposition cyclique des cellules immunitaires à des niveaux variés de PAMPs lors de la trypanosomose pourrait ainsi conduire à une modulation de la réponse des cellules macrophagiques à l'IFN- γ . Ce phénomène pourrait limiter les lésions inflammatoires chez l'hôte mais pourrait également constituer un mécanisme d'échappement du parasite à la réponse immunitaire.

Rôle du sécrétome

Le sécrétome (facteurs excrétés/sécrétés) correspond à un mélange complexe de protéines, d'hydrates de carbone et de lipides excrétés par le parasite à partir de sa surface ou sécrétés par la poche flagellaire et des vésicules d'exocytose (Geiger *et al.* 2010). Le sécrétome du trypanosome pourrait jouer un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire dans la THA. Son implication dans certains phénomènes comme l'anémie chez l'hôte par le biais de vésicules extracellulaires a été proposée (Szempruch *et al.* 2016). Il a été montré que certains composés présents dans le sécrétome comme l'indole-pyruvate peuvent diminuer la production d'IL1 et d'IL6 par les macrophages murins (Mc Gettrick *et al.* 2016). Les protéines du sécrétome seraient impliquées dans différents aspects de la physiopathogénie de la trypanosomose, comme par exemple l'induction de l'arginase macrophagique (Okenu *et al.* 1999)(Lonsdale-Eccles *et al.* 2002)(Holzmuller *et al.* 2008)(De Muylder *et al.* 2013). La composition et la fonction présumée des protéines du sécrétome ont été caractérisées dans différentes souches de trypanosomes (Grébaut *et al.* 2009)(Michelle *et al.* 2009)(Geiger *et al.* 2010) (Figure 25). Garzón *et al.* ont observé que le sécrétome de *T.b. gambiense* altère la maturation, l'activation et diminue la production de cytokines de DCs murines stimulées par le LPS. De plus, ces DCs présentent un défaut de stimulation de la réponse lymphocytaire T (Garzón *et al.* 2013). Les constituants du sécrétome à l'origine de ces effets et les voies de signalisation impliquées ne sont pas identifiés.

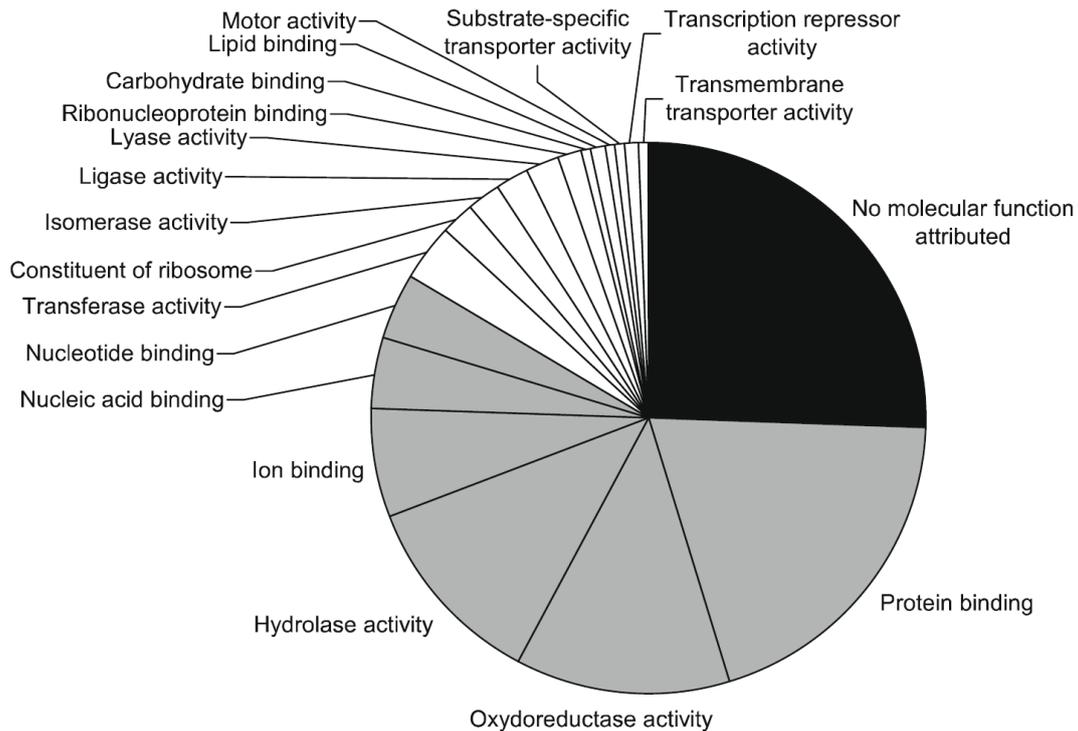


Figure 25 : Fonctions des protéines identifiées dans le sécrétome de *T.b. congolense* (Grébaut *et al.* 2009).

Rôles de l'arginase et de l'IDO

Dans les trypanosomoses, des altérations des fonctions des lymphocytes T ont été mises en évidence *in vivo* et *in vitro*. La suppression des réponses des lymphocytes T de l'hôte est l'une des caractéristiques de cette infection. Le déficit en L-arginine est principalement dû à son catabolisme par l'arginase, ce qui provoque une déplétion de cet acide aminé dans le milieu extra-cellulaire. L'activité arginase inhibe la prolifération des lymphocytes en inhibant l'expression de leur chaîne zeta du TCR (CD3zeta) (Zabaleta *et al.* 2004). L'inhibition de prolifération des lymphocytes T pourrait également être liée à l'expression de l'enzyme indoléamine 2, 3-dioxygénase (IDO). L'activité IDO a d'abord été identifiée comme un mécanisme de défense contre la croissance microbienne au cours des infections car elle induit la diminution du tryptophane, élément essentiel à la prolifération des bactéries, parasites et virus (Zelante *et al.* 2009). L'IDO dans les DCs et les macrophages a de plus été impliquée dans l'induction de la tolérance, principalement en induisant l'apoptose des lymphocytes T et la génération de

lymphocytes T régulateurs (Grohmann *et al.* 2003)(Mellor *et al.* 2004). Il a été démontré que l'infection de DCs humaines par *Leishmania major* et *L. donovani* induit l'expression d'IDO, réduisant ainsi la prolifération des lymphocytes et limitant le processus inflammatoire (Donovan *et al.* 2012). Les données sont limitées concernant le rôle de l'IDO dans la trypanosomose.

La balance Th1/Th2/Th17/Treg

Les études sur modèles animaux suggèrent que la forte réponse Th1 au début de la trypanosomose a un rôle protecteur pour l'hôte (Mansfield *et al.* 2005)(Namangala *et al.* 2009)(Drennan *et al.* 2005)(Magez *et al.* 2006)(Stijlemans *et al.* 2007). Dans ces modèles, les souris présentent une réponse IFN- γ précoce suivie d'un changement vers un profil anti-inflammatoire IL-10, IL-13 et IL-4. Ce changement dans la balance cytokinique a été observé de façon similaire dans des infections à helminthes comme *S. mansoni* et *Echinococcus multilocularis* (Vuitton *et al.* 2010). Les trypanosomes pourraient échapper à la réponse immune en induisant une réponse inadaptée de la DC orientée vers la production de cytokines de profil Th2 et en favorisant l'activation de Treg chez la souris (Pletincks *et al.* 2011). Ce dernier mécanisme pourrait conduire à la production d'IL-10 et de TGF- β qui inhibent la réponse Th1, ce qui favorise la survie du parasite (Guilliams *et al.* 2007)(Wei *et al.* 2008)(Namangala *et al.* 2011). En outre, les trypanosomes induisent une déplétion rapide du nombre absolu des lymphocytes T auxiliaires et cytotoxiques, limitant ainsi les cellules effectrices qui pourraient contribuer à son élimination (Namangala *et al.* 2007).

2.3.3.3 Modification de la balance iNOS/arginase

L'arginase

L'arginase (aminohydrolase ou L-arginine urée hydrolase) est une enzyme retrouvée dans l'ensemble du monde vivant. Chez les mammifères, elle existe sous deux isoformes : l'arginase 1 et l'arginase 2. L'arginase 1 est présente dans le cytosol des hépatocytes et des leucocytes. L'arginase 2 est localisée à la face externe de la membrane mitochondriale des cellules rénales et des leucocytes. Les arginases humaines sont actives sous la forme d'un homotrimère possédant en son

centre deux 2 ions manganèse (Mn^{2+}) (Cox *et al.* 1999)(Cama *et al.* 2003). Le principal facteur de transcription pour l'arginase 1 est STAT6 (Pauleau *et al.* 2004)(Sinha *et al.* 2005)(Liao *et al.* 2011). La fonction de l'arginase est fondamentale dans le cycle de l'urée, en particulier dans les hépatocytes, où elle catalyse la dernière réaction en hydrolysant la L-arginine en urée et en L-ornithine.

Balance iNOS/arginase

L'implication principale de l'arginase dans l'immunité est la régulation de la synthèse du NO (monoxyde d'azote) par inhibition compétitive de la iNOS dans les macrophages. En effet, l'arginase et la iNOS utilisent le même substrat qui est la L-arginine. Cette compétition est en faveur de l'arginase (Boucher *et al.* 1994). L'induction et l'expression de l'arginase sont plus précoces que celles de la iNOS, ce qui entraîne une diminution significative des pools intra- et extra-cellulaires de L-arginine, inhibant ainsi la production de NO par la iNOS (Gobert *et al.* 2000)(Duleu *et al.* 2004). Les conséquences sont : (i) une altération de la fonction des lymphocytes T induite par la déplétion en L-arginine, (ii) une diminution de la production du NO cytotoxique et (iii) une augmentation de la synthèse de L-ornithine par l'arginase, ce qui permet la production de polyamines. Ces différentes conséquences de la modification de la balance iNOS/arginase sont en faveur de la croissance des parasites au cours de la trypanosomose (Vincendeau *et al.* 2003) (Figure 26).

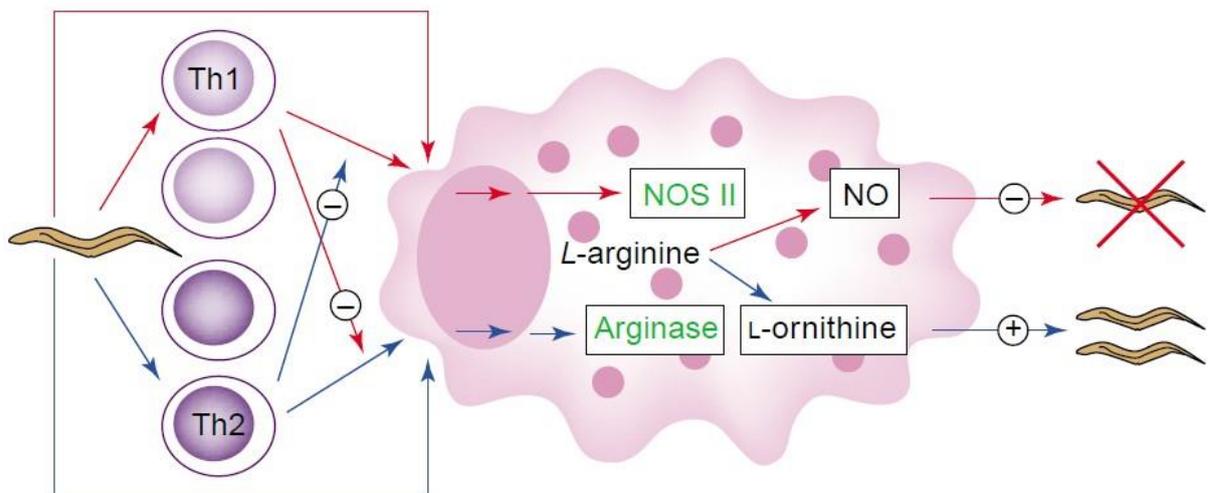


Figure 26 : Balance entre les enzymes iNOS et arginase, et rôle des macrophages sur les trypanosomes (Vincendeau *et al.* 2003).

Certaines données expérimentales sont en faveur de l'implication de l'arginase au cours de la trypanosomose. Ainsi, la croissance de *T.b. brucei* est corrélée à une augmentation de l'activité arginase au niveau des macrophages péritonéaux de souris infectées (Gobert *et al.* 2000). De plus, il a été montré que l'augmentation de l'activité de l'arginase induite par *T.b. brucei* est plus élevée dans les macrophages de souris Balb/c par rapport à ceux de C57BL/6, ce qui est en lien avec la plus grande sensibilité de la lignée Balb/c à l'infection par les trypanosomes (Duleu *et al.* 2004). De façon similaire, au cours de l'infection par *T. cruzi*, il a été montré que l'interaction entre la cruzipaine (antigène immunodominant du parasite) et les macrophages induit l'activité arginase qui déplete la L-arginine au détriment de la iNOS régulant ainsi la production du NO (Garrido *et al.* 2011). Enfin, dans la THA, la diminution du taux d'arginase sérique est associée à la guérison de patients traités (Nzoumbou-Boko *et al.* 2013).

Modulation de l'arginase

Le trypanosome pourrait favoriser l'induction de l'arginase à son profit par plusieurs mécanismes au cours de l'infection. Il a été montré que les cytokines Th1 induisent la iNOS et les cytokines Th2 induisent l'arginase dans les macrophages murins (Vouldoukis *et al.* 1996)(Munder *et al.* 2009). Les altérations de la balance Th1/Th2 observées au cours de la trypanosomose pourraient être impliquées dans la modulation de la balance iNOS/arginase, en faveur de l'arginase. En effet, les cytokines IL-4, IL-10 et IL-13, ainsi que certains facteurs de croissance, sont capables d'activer indépendamment ou en combinaison la voie de l'arginase (Osorio *et al.* 2014). De plus, après identification d'un anticorps monoclonal inhibant expérimentalement l'induction de l'arginase, le criblage d'une banque génomique a permis l'identification de *TbKHC1*, une chaîne lourde de kinésine orpheline de *T. b. gambiense*. La protéine recombinante correspondante induit directement l'arginase macrophagique (De Muylder *et al.* 2013).

2.3.3.4 Echappement par la VSG

Variation antigénique

L'infection par les trypanosomes persiste pendant plusieurs mois ou années chez l'hôte mammifère. Cette persistance de l'infection est permise par l'extrême capacité de variation antigénique du parasite, avec un changement périodique de la VSG (Rudenko *et al.* 2011). Le trypanosome présente au moins 15 sites télomériques associés à des gènes codant pour la VSG (Hertz-Fowler *et al.* 2008). Cependant, seul un de ces sites est activé à la fois (Navarro *et al.* 2001)(Navarro *et al.* 2007)(Borst *et al.* 2002). Le changement d'expression du site associé aux gènes de la VSG est réalisé sans recombinaison de l'ADN. Cependant, le génome du parasite comporte près de 1700 gènes ou pseudo-gènes de VSG (Berriman *et al.* 2005). Les gènes de VSG situés hors d'un site d'expression sont silencieux et dépourvus de promoteurs. La transcription d'un gène situé dans un site activé se fait après recombinaison ou conversion génique de séquences de gènes de la VSG (Navarro *et al.* 2007)(Borst *et al.* 2002). Cette recombinaison est possible du fait de l'homologie des régions flanquantes ou des séquences des gènes eux-mêmes, ce qui conduit à la création d'une mosaïque de gènes (Horn *et al.* 2005)(Marcello *et al.* 2005)(Morrison *et al.* 2009).

Echappement à la réponse immune

La variation antigénique de la VSG permet l'expression d'un vaste répertoire de VSG par le parasite, permettant l'échappement à la réponse immunitaire spécifique de l'hôte. Lors de l'infection, les anticorps de l'hôte dirigés contre les constituants variants des trypanosomes se lient à la surface membranaire des parasites et participent à la diminution de la parasitémie. Cependant, les quelques trypanosomes porteurs des VSG nouvellement modifiées peuvent échapper aux anticorps produits par l'hôte. Ces variants se multiplient pour former la vague de parasitémie suivante (Figure 27). La variation de la VSG présente de plus une dynamique complexe au cours de l'infection et diffère selon les formes longues (*slender*) et les formes trapues (*stumpy*) du parasite (McGregor *et al.* 2012).

Par ailleurs, l'activation polyclonale lymphocytaire B observée dans la trypanosomose s'accompagne de la production d'auto-anticorps parfois à l'origine de manifestations auto-immunes (Guilbert *et al.* 1982)(Kirrstetter *et al.* 2004). Au

stade tardif de l'infection, la réponse lymphocytaire B est fortement altérée avec une faible production d'anticorps, principalement de type IgM (Sacks *et al.* 1980).

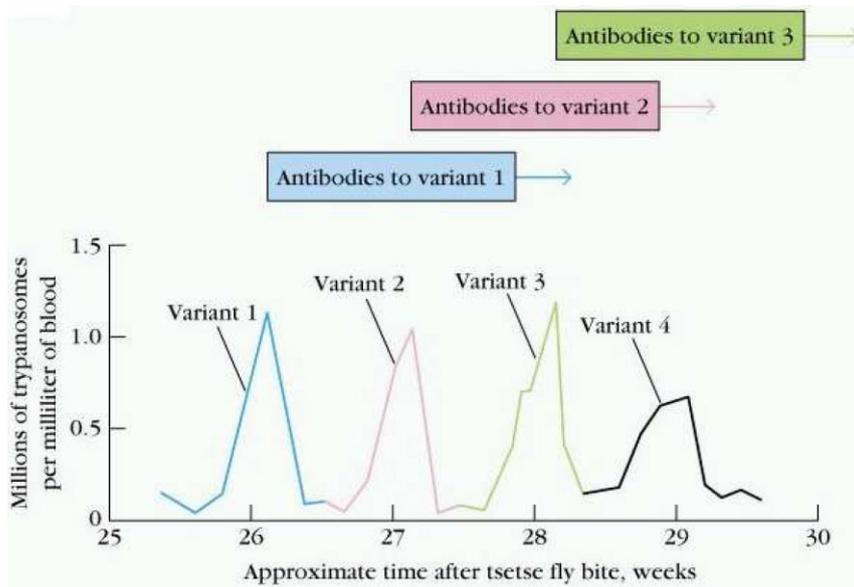


Figure 27 : Variation antigénique des trypanosomes (Commutation antigénique) (<http://home.inje.ac.kr/~lecture/immunobiotech/ch2>).

Travaux de recherche

3 Travaux de recherche

Du fait de l'intérêt potentiel de CYP51 en tant que cible thérapeutique dans la THA, nous avons étudié dans un premier travail le caractère essentiel de cette enzyme chez *T. brucei* et l'effet de son inhibition dans un modèle expérimental. Ce travail a donné lieu à une publication dans le journal PLoS neglected tropical diseases.

En raison de l'implication du sécrétome de *T.b. gambiense* dans différents mécanismes immunopathologiques de la THA et du rôle important des DCs au cours de cette infection, j'ai étudié dans un deuxième travail l'effet de ce sécrétome sur les caractéristiques phénotypiques de DCs humaines. Il s'agit d'un travail en cours qui est présenté sous la forme d'un manuscrit.

Un des éléments du sécrétome, une kinésine orpheline, est impliqué dans l'induction de l'arginase chez l'hôte, ce qui favorise la croissance du parasite. Il s'agit d'une thématique de recherche développée de longue date dans le laboratoire et qui est poursuivie. Ma contribution dans ce troisième travail a consisté en la participation aux expériences *in vitro* concernant l'arginase, ainsi qu'à l'administration des médicaments à l'animal. J'ai également contribué à la rédaction du manuscrit. Ce travail fait appel à de nombreuses techniques dont notre laboratoire a été le principal pôle de réalisation des investigations *in vitro* et *in vivo*. Ce travail a donné lieu à un troisième manuscrit, soumis pour publication.

Article 1

RESEARCH ARTICLE

Trypanosoma brucei CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model

Frédéric-Antoine Dauchy^{1,2,3*}, Mélanie Bonhivers^{4,5}, Nicolas Landrein^{4,5}, Denis Dacheux^{4,5,6}, Pierrette Courtois^{1,2}, Florian Lauruol^{1,2}, Sylvie Daulouède^{1,2}, Philippe Vincendeau^{1,2,7}, Derrick R. Robinson^{4,5}

1 University of Bordeaux, laboratoire de parasitologie, France, **2** IRD-CIRAD-University of Bordeaux, France, **3** University Hospital of Bordeaux, Department of infectious and tropical diseases, Hôpital Pellegrin, France, **4** University of Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, France, **5** CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, France, **6** Bordeaux INP, ENSTBB, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, France, **7** University Hospital of Bordeaux, laboratoire de parasitologie, Hôpital Pellegrin, France

✉ These authors contributed equally to this work.

* frederic.dauchy@chu-bordeaux.fr



 OPEN ACCESS

Citation: Dauchy F-A, Bonhivers M, Landrein N, Dacheux D, Courtois P, Lauruol F, et al. (2016) *Trypanosoma brucei* CYP51: Essentiality and Targeting Therapy in an Experimental Model. PLoS Negl Trop Dis 10(11): e0005125. doi:10.1371/journal.pntd.0005125

Editor: Jayne Raper, Hunter College, CUNY, UNITED STATES

Received: May 13, 2016

Accepted: October 24, 2016

Published: November 17, 2016

Copyright: © 2016 Dauchy et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research was supported by internal funding and support from the ANR, LABEX ParaFrap, ANR-11-LABX-0024 and from the Association pour le développement de la recherche en parasitologie et médecine tropicale. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Trypanosoma brucei gambiense is the main causative agent of Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness. Because of limited alternatives and treatment toxicities, new therapeutic options are urgently needed for patients with HAT. Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) is a potential drug target but its essentiality has not been determined in *T. brucei*. We used a tetracycline-inducible RNAi system to assess the essentiality of CYP51 in *T. brucei* bloodstream form (BSF) cells and we evaluated the effect of posaconazole, a well-tolerated triazole drug, within a panel of virulent strains *in vitro* and in a murine model. Expression of CYP51 in several *T. brucei* cell lines was demonstrated by western blot and its essentiality was demonstrated by RNA interference (CYP51^{RNAi}) *in vitro*. Following reduction of TbCYP51 expression by RNAi, cell growth was reduced and eventually stopped compared to WT or non-induced cells, showing the requirement of CYP51 in *T. brucei*. These phenotypes were rescued by addition of ergosterol. Additionally, CYP51^{RNAi} induction caused morphological defects with multiflagellated cells ($p < 0.05$), suggesting cytokinesis dysfunction. The survival of CYP51^{RNAi} Doxycycline-treated mice ($p = 0.053$) and of CYP51^{RNAi} 5-day pre-induced Doxycycline-treated mice ($p = 0.008$) were improved compared to WT showing a CYP51 RNAi effect on trypanosomal virulence in mice. The posaconazole concentrations that inhibited parasite growth by 50% (IC₅₀) were 8.5, 2.7, 1.6 and 0.12 μM for *T. b. brucei* 427 90–13, *T. b. brucei* Antat 1.1, *T. b. gambiense* Feo (Feo/ITMAP/1893) and *T. b. gambiense* Biyamina (MHOM/SD/82), respectively. During infection with these last three virulent strains, posaconazole-eflornithine and nifurtimox-eflornithine combinations showed similar improvement in mice survival ($p \leq 0.001$). Our results provide support for a CYP51 targeting based treatment in HAT. Thus posaconazole used in combination may represent a therapeutic alternative for trypanosomiasis.

Competing Interests: I have read the journal's policy and the authors of this manuscript have the following competing interests: We thank Dr. Pérez Perez Simarro and Jose Ramon Franco (World Health Organization) for the supply of eflornithine (ornidyl, Sanofi aventis) and nifurtimox (lampit, Bayer). Merck Sharp & Dohme Corp and Bayer provided posaconazole and nifurtimox respectively, for in vitro experimentation. The companies (Sanofi aventis, Bayer, Merck Sharp & Dohme Corp) did not play any additional role in the study aside from providing supplies.

Author Summary

Human African trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness, is a parasitic disease exclusively located in sub-Saharan and southern Africa where it is transmitted by infected tsetse flies and is caused by a blood parasite named *Trypanosoma brucei*. Because of limited alternatives, toxicity and high expense new treatment options are urgently needed for patients with this deadly disease and related diseases. Sterols are important for building cell membranes and are precursors for the synthesis of powerful bioactive molecules, such as steroid hormones in mammals. Among the enzymes required for sterol production, one class (named CYP51), share similar functions and importantly these enzymes are found in all biological kingdoms, including in the sleeping sickness parasite. We have studied the role of trypanosome CYP51 and found that when native levels are diminished experimentally, parasite survival and division are radically diminished resulting in cell death but this can be rescued by the addition of ergosterol. We observed that parasites with diminished level of CYP51 enzyme were less virulent in mice. We also show that posaconazole, a clinically used antifungal and potential CYP51 inhibitor, augments parasite killing when used in combination with currently used trypanocidal drugs. Thus our results suggest that a specific targeting of the enzyme could be a potential strategy to treat HAT.

Introduction

Trypanosoma brucei gambiense and *rhodesiense* are the causative agents of Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness. These flagellated protozoan parasites live and multiply extracellularly in the blood and tissue fluids of the host. *Trypanosoma brucei gambiense* causes a chronic form of HAT in West and Central Africa that progress in two stages: a first early or hemolymphatic stage, and a second late or meningoencephalitic stage [1]. Treatment for first-stage relies on pentamidine and treatment for second-stage relies on nifurtimox + eflornithine (α -difluoromethylornithine, DFMO) combination therapy (NECT) since 2009 [2,3]. Eflornithine is an inhibitor of the first step of polyamine biosynthesis, the formation of putrescine from ornithine by ornithine decarboxylase, and was registered more than 25 years ago in HAT treatment [4,5]. Attempts to reduce eflornithine-based therapy have resulted in its evaluation in combination with nifurtimox [6]. Nifurtimox is believed to exert its biological activity through superoxide anions and nitro anion radicals generated following reduction of the nitro-group, which is attached to the aromatic ring [7]. Nevertheless, nifurtimox has many adverse effects such as: gastrointestinal manifestations, weight loss, fatigue, headache, mood changes, arthralgia, myalgia, skin rash and peripheral neuropathy [8]. It is also considered as genotoxic. Thus, safer and effective therapeutic options for patients with HAT are clearly needed.

Sterol biosynthesis is a crucial pathway in eukaryotes leading to the production of cholesterol in animals and various C24-alkyl sterols (ergostane-based sterols) in fungi, plants, and *Trypanosomatidae*. Sterols are important membrane components and precursors for the synthesis of bioactive molecules, including steroid hormones in mammals. Precise functions of sterol synthesis in protozoa, however, are not well characterized. In these parasites, sterols are produced from acetyl-CoA via a multistep metabolic pathway. Sterol 14 α -demethylase (cytochrome P450 family 51 (CYP51)) catalyzes removal of a 14 α -methyl group from lanosterol [9,10]. Recently, CYP51 has been shown as essential in *Leishmania donovani* [11]. Nevertheless, data are limited regarding *T. brucei* sterol biosynthetic pathway. Contrary to

other *Trypanosomatidae*, *T. brucei* bloodstream forms are known to build their membranes using host cholesterol from the human plasma [12]. However, it has been shown that, under conditions of cholesterol abundance, parasite endogenous sterol biosynthesis is downregulated but not eliminated completely [13,14]. The very small amount of ergosterol derivatives in *T. brucei* suggests that, in the mammalian host, *T. brucei* require functional endogenous sterols as metabolic or signal molecules [13,15]. To date, data are nevertheless lacking regarding the essentiality of CYP51 in *T. brucei* bloodstream forms [16,17].

It has been previously reported that some azole derivatives are active *in vitro* against *T. brucei* bloodstream forms [18]. Alterations in the sterol composition of the parasite are observed upon these treatments, with decrease in the ergosterol formation and accumulation of the C14 methylated precursors providing direct evidence that the mode of action of these drugs is connected with CYP51 inhibition. Posaconazole is a registered extended-spectrum triazole with demonstrated efficacy as antifungal treatment for human refractory invasive fungal infections [19,20] and as prophylaxis in high-risk patients [21,22]. It is usually considered as well-tolerated, although some adverse events have been reported such as diarrhea, headache or fever [23]. Elevation of serum transaminase concentrations is infrequent (2%-3%) [24]. Crystal structures of CYP51 from *T. brucei* have been determined and its binding to posaconazole has been studied [25,26]. Additionally, posaconazole was shown to be active in experimental models caused by related parasites such as *Leishmania amazonensis* and *donovani* [27,28] or *Trypanosoma cruzi* [29]. During HAT, combined therapy is envisioned as an approach to favor since it may improve treatment efficacy whilst decreasing toxicity and the likelihood of resistance development. To date, no data on posaconazole effect in HAT are available.

Given the interest of CYP51 as a drug target and the severity of disease caused by *T. brucei*, we investigated the essentiality of *T. brucei* CYP51 and we evaluated the effect of posaconazole alone and in combination with eflornithine *in vitro* and in a murine model of African trypanosomiasis.

Material and Methods

Parasites

For *in vitro* experiments on a model strain, we used the bloodstream form (BSF) *T. brucei brucei* 427 90.13 cell line, co-expressing the T7 RNA polymerase and tetracycline repressor, named wild type (WT) in this study [30]. WT parasites were grown in IMDM medium as described in [31] containing 10% heat-inactivated fetal calf serum, 36 mM sodium bicarbonate, 136 µg/ml hypoxanthine, 39 µg/ml thymidine, 110 µg/ml sodium pyruvate, 28 µg/ml bathocuprone, 0.25 mM β-mercaptoethanol, 2 mM L-cysteine, kanamycin (62.5 µg/mL), neomycin (2.5 µg/mL), and hygromycin (5 µg/mL) (from now on called complete IMDM). For animal study, we used the following three pleomorphic strains: *T. b. brucei* Antat 1.1 (*T. b. brucei* Antat 1.1 EATRO 1125), *T. b. gambiense* Biyamina (MHOM/SD/82) and *T. b. gambiense* Feo (Feo/ITMAP/1893) [32–35]. These last two strains belong to *T. b. gambiense* group 2. Indeed, *T. b. gambiense* Biyamina has been previously confirmed as group 2 [36]. We also identified, using mini- and micro-satellite analysis, that *T. b. gambiense* Feo also belongs to group 2 [37–39] (S1 Table). These pathogenic strains are currently conserved as frozen stabulates in our laboratory. *Leishmania tarentolae* (strain LEXSY host T7-TR, Jena Bioscience GmbH, Germany) was used for western-blot control.

Construction of plasmid and transfection

We used the tetracycline-inducible RNAi interference (RNAi) system [30,40–42] to assess the essentiality of CYP51 in *T. brucei* 427 90.13 BSF cells. The *CYP51* gene (accession number

Tb927.11.6210) was identified from the TriTrypDB kinetoplastid genomics resource (<http://tritrypdb.org>) [43]. A portion (bp 389 to 855) of *CYP51* was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from *T. brucei* 927 genomic DNA with the primers 899-F (5'-GCCGGCCGCTCTAGATTGCGGAGGAATTAACCATCGC-3') and 900-R (5'-TAAGCTTGCTCTAGATCATGCCACATACCTCGTGTTAGG-3'). The PCR product was purified and the 496 bp fragment was cloned in p2T7tiB plasmid [44] digested with *Xba*I using the In-Fusion cloning kit (Clontech), and the sequence was checked by DNA sequencing. The *Not*I linearized plasmid was transfected by electroporation in *T. brucei* 427 90–13 as described in [45]. After 24 hours, transfected cells were diluted in culture medium supplemented with phleomycin (2.5 µg/mL) and selected after cloning by serial dilution into 24-well plates. After 5 to 10 days, transformants were induced with tetracycline (10 µg/mL) and several clones were collected and displayed similar growth reduction upon induction. One clone was selected for further studies. To verify for ergosterol biosynthesis specificity, the rescue of the *CYP51^{RNAi}* phenotype was tested by adding 5 µM ergosterol (Sigma catalogue # E6510) in the culture medium.

Western blotting

In order to study *CYP51* expression, cells extracts from the different strains (2.5×10^6 cells, virulent *T. brucei* and *T. b. gambiense* purified from rodent blood, *T. brucei* 427 90–13 WT, *CYP51^{RNAi}* non-induced and *CYP51^{RNAi}* induced) were loaded on a 10% SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane. Membranes were blocked in blocking solution (tris-buffered saline (TBS), 0.2% Tween-20, 5% skimmed milk powder) for 1 hour, and incubated overnight at 4°C with the primary antibody anti-*CYP51* (A kind gift from Dr. James. H. McKerrow, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, U.S.A) [11] diluted in blocking solution at 1:5,000. After 3 washes (10 min) in TBS, 0.2% Tween-20, the membranes were incubated for 1 hour at room temperature with anti-rabbit HRP (horseradish peroxidase)-conjugated secondary antibody (Sigma A-9169) diluted at 1:10,000 in blocking solution. After 3 washes in blocking solution and 2 washes in TBS, membranes were revealed by ECL (Clarity Biorad chemiluminescence). Membranes were stripped 2 times 5 min in glycine 100 mM pH2.3, 1% SDS, 0.1% NP40 (Igepal), washed in TBS for 30 min, blocked in blocking solution for 1hr and processed with the loading control anti-GAPDH (a kind gift from Paul Michels, University of Edinburgh, U.K.) at 1:1,000 dilution. The signals of three independent experiments were quantified using ChemiDoc XRS+ (Biorad) and Image Lab 5.1 software.

Immunofluorescence

WT, *CYP51^{RNAi}* non-induced and induced cells were fixed in 3% paraformaldehyde in PBS for 2 minutes. After PFA fixation (3%), glycine was added (100 mM in PBS, 10 min) and cells were spread on poly-L-lysine-coated slides. Cells were permeabilized with Triton-X100 0.2% in PBS for 10 min and washed once in PBS. Samples were incubated with the primary antibody for 1 hour at room temperature in a moist chamber: anti-PFR (mouse monoclonal L8C4, neat, a kind gift from Pr. K. Gull, Oxford University). After two PBS washes, cells were incubated for 45 min with the secondary antibody anti-mouse conjugated to FITC (Sigma F-2012, 1:100 dilution). Nuclei and kinetoplasts were labeled with DAPI (10 µg.mL⁻¹ in PBS for 5 minutes) and washed twice in PBS for 5 minutes. Slides were mounted with Slowfade Gold (Molecular Probes S-36936).

Effect of posaconazole on *CYP51^{RNAi}* cells

Cultures were performed in 24-well plates. Each well was filled with 500 µL of complete IMDM medium. Posaconazole was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (6 mM stock) and stored at -80°C. For experiments, new dilutions were prepared in culture medium to

ensure that the DMSO concentration in the culture medium did not exceed 0.1%. Adequate dilutions of the drug were added to 2×10^5 /mL WT, non-induced and RNAi induced parasites with tetracycline (10 μ g/mL), after 5 days and 10 days of RNAi induction. Cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ incubator for 24 hours. Parasite counts were then done in a Malassez. Results were expressed as dose-effect curves. Growth curve of WT parasites incubated with DMSO 0.1% were similar to control. Experiments were performed three independent times and mean and standard error to the mean (sem) were calculated.

Effect of posaconazole *in vitro* on animal strains

T. b. brucei Antat 1.1, *T. b. gambiense* Biyamina or *T. b. gambiense* Feo stabilates were defrosted, inoculated into mice and then purified from rodent blood using DEAE-cellulose columns, as previously described [46]. Assays were performed in 96-well plates. Each well was filled with 10^5 parasites in 200 μ L of RPMI culture medium, with appropriate dilutions of drugs, supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 25 mM HEPES, 2 mM sodium pyruvate and 0.1 mM 2-mercaptoethanol (from now on called complete RPMI) [32,47]. Cultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ incubator for 24 hours and the efficacy was expressed in concentration inhibiting parasite growth by 50% (IC₅₀) [48]. Experiments were performed three independent times and the mean and sem of the IC₅₀ for each drug were calculated.

Additionally, in order to test if posaconazole effect is dependent on the sterol biosynthesis pathway in pleomorphic strains, we cultured bloodstream *T. b. brucei* Antat 1.1 parasites in the presence of ergosterol and different amounts of posaconazole. Ergosterol (Sigma catalogue # E6510) was dissolved in chloroform as 125 mM stock. For experiments, ergosterol was diluted at 50 μ M concentration as used in [49]. Dilutions were prepared to ensure that the chloroform concentration in the culture medium did not exceed 0.01%. Ergosterol, posaconazole or their combinations were added at the same time to cultures.

Animal model

This investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication No. 85–23, revised 1996). Agreement (number A33-063-324) was obtained from French authorities and all the protocols used were approved by our local ethics committee *Comité d'éthique régional d'Aquitaine* (protocol number: 215122414261294). Female Swiss (OF-1) mice eight to ten weeks old, 18–25 g, (Charles River, L'Arbresle, France) were kept in our animal housing facility fifteen days before the experiment was started. They were housed six mice to a cage in ventilated boxes kept in a protected temperature and humidity-controlled room, with a 12 hours on/off light cycle. The animals were given free access to food and water. Efforts were made to minimize the suffering of animals used.

In order to test the effect of CYP51 RNAi on parasite virulence, mice (eight per group) were infected at day 1 by subcutaneous injection with 10^4 WT, CYP51^{RNAi} non-induced or CYP51^{RNAi} pre-induced (*in vitro* for 5 days with tetracycline) parasites. Mice were given either normal water or water containing 200 μ g/mL doxycycline in a 5% sucrose solution [50]. The drinking water with or without doxycycline was provided 3 days before infection and changed every day. Parasitemia levels were monitored every day during the whole experiment.

In order to test the effect of the different drugs used, mice were infected at day 1 by subcutaneous injection with 10^4 bloodstream form parasites of *T. b. brucei* Antat 1.1 (twelve mice per group), *T. b. gambiense* Biyamina (MHOM/SD/82) (twelve mice per group) or *T. b. gambiense* Feo (Feo/ITMAP/1893) (eight mice per group). After inoculation, mice were randomly separated into four groups of treatment for each strain. The different groups were: (i) controls, (ii)

posaconazole, (iii) eflornithine, (iv) posaconazole + eflornithine and (v) nifurtimox + eflornithine. Treatments started at day five post-inoculation. In order to mimic the NECT treatment, eflornithine was given the first seven days of treatment, while nifurtimox was given ten days. Nifurtimox was administered at a total of 20 mg/kg/day and was given in two doses by oral gavage with 12 hours between each dose. Eflornithine was continuously available in the drinking water, over seven consecutive days. Each mouse consumed an average of 3 mL of 2% eflornithine per day, which yielded a mean dosage of 3.2 g/kg of body weight per day [4,51]. Posaconazole was provided as Noxafil oral suspension (Merck Sharp & Dohme Corp.) and was administered twice a day by oral gavage. For the posaconazole + eflornithine combination, eflornithine was given the first seven days of therapy (from day 5 to day 11 post-inoculation) and posaconazole was given for ten days (from day 5 to day 14 post-inoculation). Blood samples were taken daily from the tip of the tail to assess parasitemia [52]. Animals were followed for survival or relapse until day 180.

Data analysis

Data were expressed as mean \pm standard error to the mean (sem) of n experiments. *In vitro* data were analyzed using a Mann-Whitney non-parametric test. Animal survival was analyzed using Kaplan-Meier survival plots and log rank test. Statistical analyses were done using STATA software (version 9.2, Stata corporation, college station, TX). Values were considered statistically significant with $p < 0.05$.

Results

TbCYP51 gene is conserved and syntenic

T. b. gambiense Biyamina (MHOM/SD/82) and *T. b. gambiense* Feo (Feo/ITMAP/1893) were used in these studies and these strains belong to *T. b. gambiense* group 2 (S1 Table). A single-copy gene, located on chromosome 11 of the *T. brucei brucei* genome, encodes the *TbCYP51* (sterol 14- α -demethylase) protein (Tb927.11.6210). BLAST analysis, using parasite Tri-TrypB database, identified an 84% sequence identity between *T. brucei* and *Leishmania donovani* (*Ld*). Conversely, the amino acid sequence identity to mammalian CYP51 was low (24%). CYP51 genes shown very similar locations with regard to their respective flanking genes amongst *Trypanosomatidae* (*T. brucei gambiense*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. cruzi*, *Leishmania major* and *L. donovani*), indicating that *CYP51* gene synteny is preserved amongst these species.

TbCYP51 is expressed in bloodstream form

TbCYP51 encodes a typical CYP51 protein with a predicted signal peptide at the N-terminus (aa 1–24). *TbCYP51* is a 481 aa protein with a predicted molecular mass of 51.5 kDa after signal peptide cleavage. *TbCYP51* has been the subject of structural studies [26,53,54] but, to our knowledge, there was no direct evidence of expression of this protein in *T. brucei* BSF. As *TbCYP51* and *LdCYP51* proteins share 84% of identity, we used the anti-*LdCYP51* antibody described by McCall and colleagues [11] to probe the kinetoplasts used in this study by western-blot. A band at the expected size was observed demonstrating that *TbCYP51* is expressed in *T. brucei* BSF and *T. b. gambiense* cells (Fig 1).

Ergosterol can rescue lethal *CYP51*^{RNAi} knockdown phenotypes in bloodstream forms

To assess the functional role of *TbCYP51* in the parasite, we used the tetracycline-inducible RNA interference (RNAi) system in *T. brucei* 427 90–13 BSF cells [30]. From day 1, a reduced

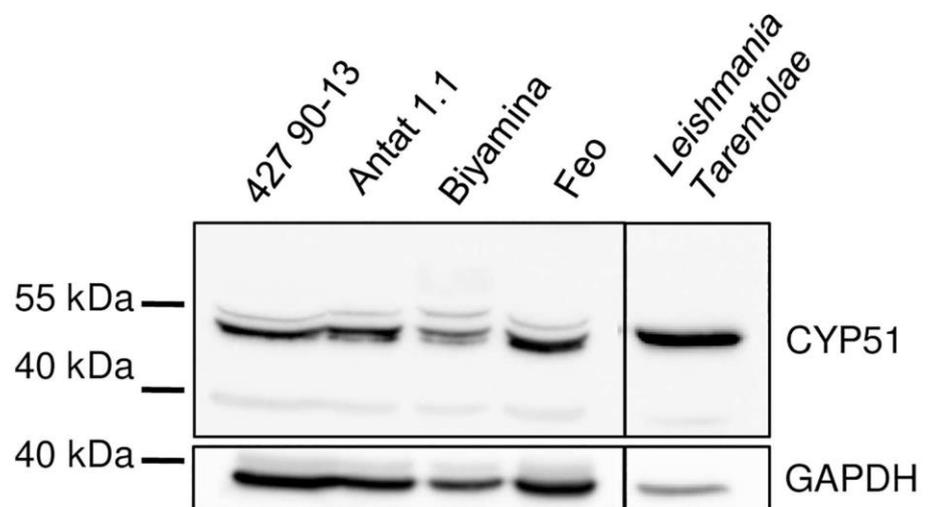


Fig 1. *TbCYP51* is expressed in *T. brucei* bloodstream forms. Western blot analysis of *TbCYP51* expression in bloodstream forms of *T. b. brucei* Antat 1.1, *T. b. gambiense* Biyamina, *T. b. gambiense* Feo and *Leishmania tarentolae* strains using anti-*LdCYP51*. Lower panel is anti-GAPDH loading control.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g001

growth rate was observed for induced cells compared to the non-transformed parental cell line (WT) and the non-induced *CYP51^{RNAi}* cells. Cell growth arrest and cell death were observed after 14 days of induction. Addition of 5 μ M ergosterol to the culture medium rescued the growth defect phenotypes, demonstrating that *TbCYP51* is essential in *T. brucei* BSF (Fig 2A). Western-blot analysis of *TbCYP51* expression level showed that RNAi induction reduced the expression of the protein (Fig 2B upper panel). Indeed, densitometry data indicate that at 5 days of induction, CYP51 protein levels had lowered by 26.0% (sem = 7.5) compared to WT levels and by 27.0% (sem = 6.9) and by 46.0% (sem = 5.8) at 10 days and 14 days ($p < 0.05$), respectively (Fig 2B lower panel). A slight reduction of expression (18%, sem = 8.0) was also observed in non-induced cells when compared to WT cells, but this suggests that a slight decrease in CYP51 expression does not affect cell growth. Taken all together, these results suggest that ergosterol synthesis via *TbCYP51* is essential in *T. brucei* BSF.

CYP51^{RNAi} induction also induced some morphological defects. By immuno-fluorescence labeling using an antibody directed to the paraflagellar rod (a structure of the flagellum involved in motility) [55], we observed that *CYP51^{RNAi}* induction led to multiflagellated cells, a landmark for cytokinesis defect in BSF (Fig 2C). Mean multiflagellated cell counts in three experiments were: 5.8% (sem = 0.6), 8.7% (sem = 2.6) and 53.7% (sem = 5.0) in WT, non-induced and 5 days induced cells, respectively ($p < 0.05$). At d14 of induction, PFR labelling was of poor quality because most of the cells were dead or dying, and therefore could not be clearly counted, however multiflagellated cells were still observable.

RNAi knockdown of *TbCYP51* reduces sensitivity to posaconazole

Adequate dilutions of posaconazole were added to 2×10^5 WT parasites to determine the concentration inhibiting parasite growth by 50% (IC_{50}). Dose-effect curves at 24 hours of culture showed that the WT strain was sensitive to posaconazole with an IC_{50} of 10 μ M. This posaconazole dose-effect curve was repeated ($n = 5$) with non-induced and *CYP51^{RNAi}* induced cells to assess the posaconazole sensitivity when CYP51 expression is reduced. After 5 days of

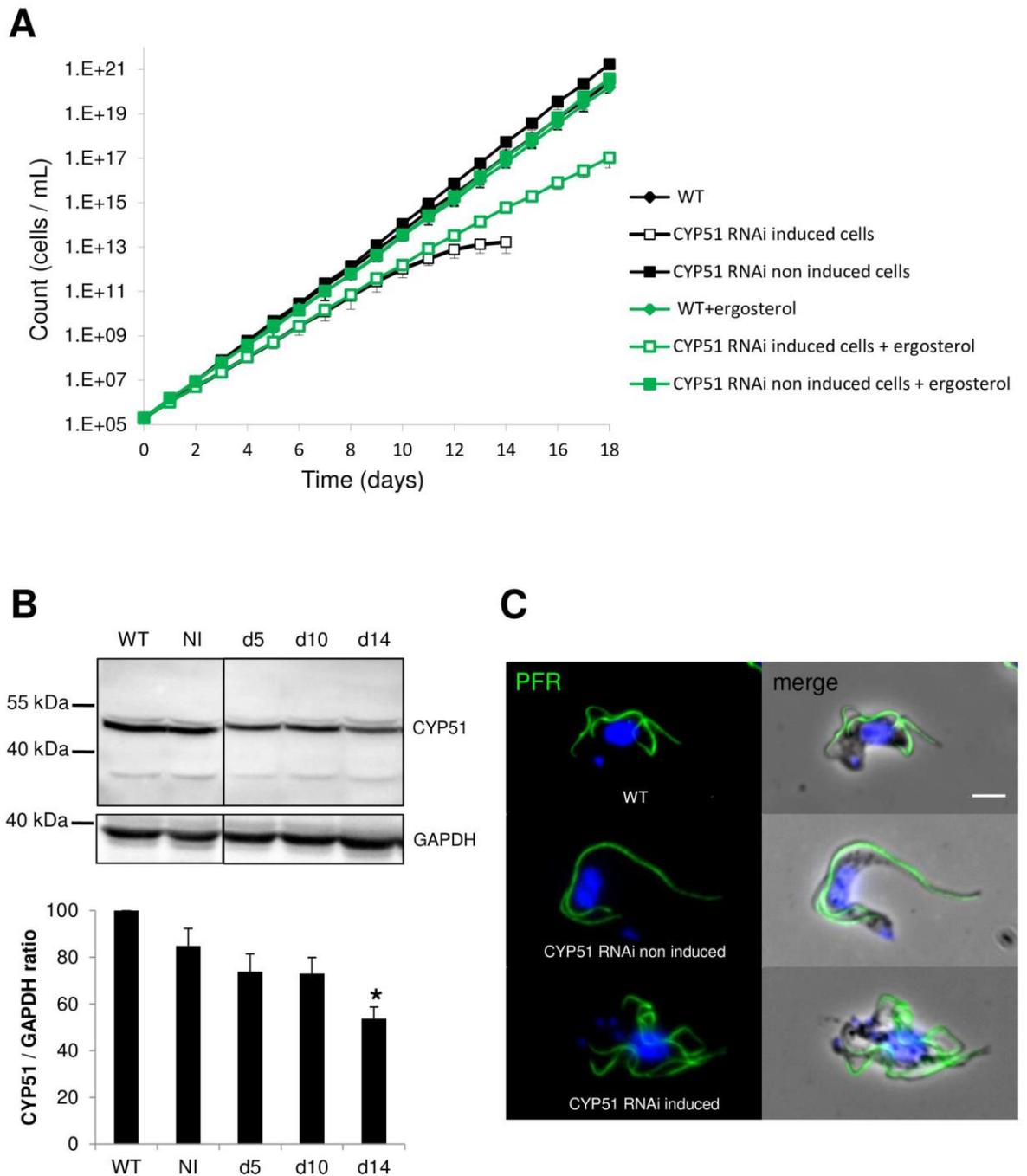


Fig 2. *TbCYP51* RNAi knockdown is lethal in BSF and can be rescued by ergosterol. A. Growth curve of WT, non-induced and *TbCYP51^{RNAi}* induced cells plus or minus ergosterol (5 μ M) indicating cell growth arrest and death after 14 days of induction but rescue in the presence of ergosterol. B. Upper panel: Western blot of CYP51 for Wild Type (WT), non-induced (NI) and *TbCYP51^{RNAi}* induced cells at day 5 (d5), day 10 (d10) or day 14

(d14). Lower panel: quantification of the western blot. * $p < 0.05$. C. Phenotype analysis by immunofluorescence using anti-PFR2 antibody (green). Nuclei and kinetoplasts are DAPI stained (blue). Scale bar represents 5 μm . Error bars in A, B represent the standard error to the mean (sem) from 3 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g002

CYP51^{RNAi} induction, cells were incubated with increasing concentrations of posaconazole for 24 hours, and the parasites were counted (Fig 3). Interestingly, CYP51^{RNAi} induced cells were less sensitive to posaconazole than WT cells (IC₅₀ was 8.5 μM) since the IC₅₀ of non-induced and CYP51^{RNAi} induced cells were 12.3 μM and 16.5 μM respectively, reflecting the reduction of *Tb*CYP51 expression in non-induced and in induced cells as previously observed by western-blot. This suggests a functional link between CYP51 and posaconazole mechanism of action.

RNAi knockdown of *Tb*CYP51 reduces virulence in a mouse model

In order to test the role of *Tb*CYP51 in virulence and *in vivo*, we infected doxycycline treated and untreated mice with CYP51^{RNAi} parasites or with CYP51^{RNAi} parasites that were pre-induced in culture for 5 days (Fig 4), and then monitored mouse survival rates. Parasites were pre-induced for five days because the WT and the non-induced CYP51^{RNAi} strains caused an acute infection in mice, which killed them on average at day 7 *i.e.*, before RNAi-induced cell death observed *in vitro*. The survival of Doxycycline un-treated WT (WT-Dox), Doxycycline-treated WT (WT+Dox), and CYP51^{RNAi} Doxycycline-untreated (CYP51^{RNAi}-Dox) groups of infected mice were compared, by pairs, using survival analysis test (Kaplan-Meier and log rank test), and showed no difference since the Log rank *p* values were comprised between 0.74 and 0.79. The CYP51^{RNAi} Doxycycline-treated group (CYP51^{RNAi}+Dox) showed improved survival compared to CYP51^{RNAi}-Dox ($p = 0.044$), and to WT-Dox or WT+Dox ($p = 0.053$ and

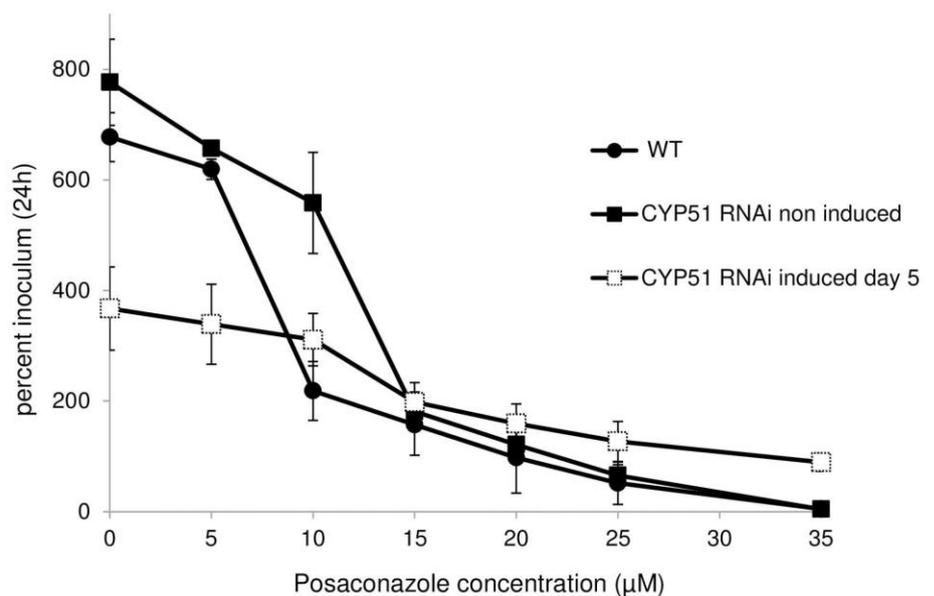


Fig 3. Induced-*Tb*CYP51^{RNAi} cells are less sensitive to posaconazole. Dose-effect curves of posaconazole for WT, non-induced and CYP51^{RNAi} induced cells at day 5 (d5). Cells were inoculated at 2×10^5 cells/mL and incubated in complete IMDM medium supplemented with 10% FCS and with increasing concentrations of posaconazole (from 0 to 35 μM). After 24 hours of treatment, cell number was calculated and expressed graphically as a percentage of the initial inoculum. Error bars represent the standard error to the mean (sem) from 5 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g003

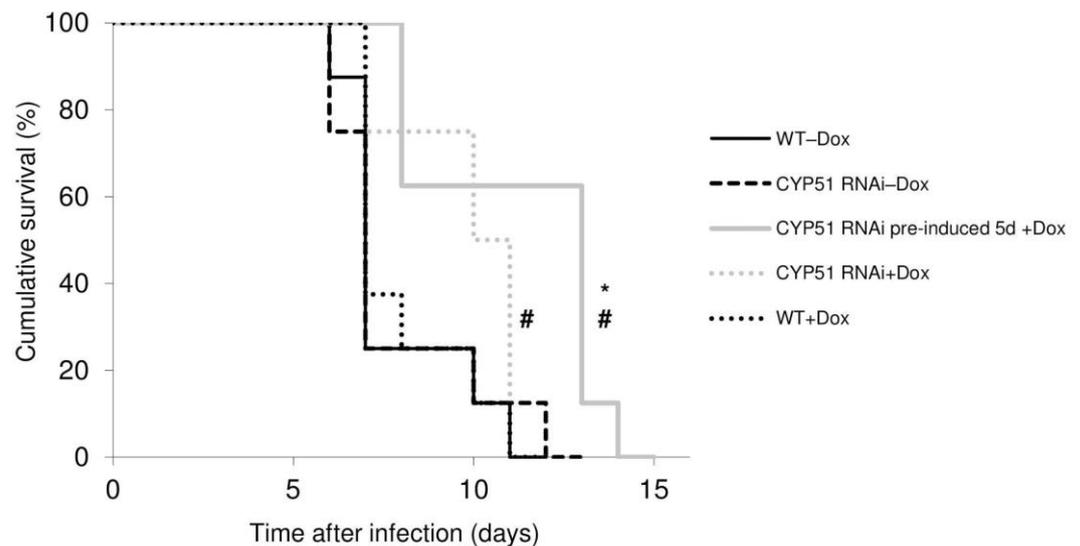


Fig 4. The effect of CYP51 RNAi on parasite virulence. In order to test the effect of CYP51 RNAi on parasite virulence, mice were infected at day 1 by subcutaneous injection with 10^4 WT, or non-induced CYP51^{RNAi}, or with CYP51^{RNAi} pre-induced (5 days) parasites. Mice (8 per group), were given either untreated water or water containing 200µg/mL Doxycycline in a 5% sucrose solution. The drinking water with or without Doxycycline was provided 3 days before infection and changed daily. The survival of untreated Doxycycline WT (WT-Dox), Doxycycline-treated WT (WT+Dox), and CYP51^{RNAi} Doxycycline-untreated (CYP51^{RNAi}-Dox) groups of infected mice were compared, by pairs, using survival analysis test (Kaplan-Meier and log rank test). #Significant $p < 0.05$ compared to CYP51^{RNAi}-Dox (non-induced cell). *Significant $p < 0.05$ compared to CYP51^{RNAi}-Dox, WT-Dox and WT+Dox.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g004

$p = 0.062$ respectively). Further, the 5-day pre-induced Doxycycline-treated group (CYP51^{RNAi} pre-induced 5d +Dox) showed significant improved survival compared to CYP51^{RNAi}-Dox, and to WT-Dox or WT+Dox ($p = 0.007$, $p = 0.008$, $p = 0.013$ respectively). This shows that knockdown of expression of *TbCYP51 in vivo* reduces parasite virulence.

Posaconazole is effective *in vitro* on animal strains

The long-term objective of this study is to target *TbCYP51 in vivo*. We thus first assess the sensitivity to posaconazole, nifurtimox, eflornithine, and pentamidine of the infectious strains *T. b. brucei* Antat 1.1, *T. b. gambiense* Biyamina, and *T. b. gambiense* Feo [32–35]. These strains were used to inoculate mice, parasitemia was checked, and parasites were purified from blood on DEAE-cellulose columns. Parasites were then incubated for 24 hours in medium containing different concentrations of the above mentioned compounds. The IC₅₀ results are reported in Table 1. The cytotoxic activities were similar between posaconazole and nifurtimox, for the same strain. Combination testing with determination of the Fractional Inhibitory Concentration (FIC) Index was performed for different drug combinations [56]. We checked for synergistic effects when nifurtimox plus eflornithine (NECT) or posaconazole plus eflornithine (PECT) or posaconazole plus nifurtimox (PON) when tested in the pairs as mentioned *i.e.*, NECT, PECT or PON, or alone. Although a pair was more effective than individual drugs, we did not find any synergistic nor antagonistic effect. All the combinations of drugs were additive or indifferent, with fractional inhibitory concentration index ≥ 1.0 and ≤ 4.0 .

Additionally, to confirm that the posaconazole effect is indeed dependent on the ergosterol biosynthesis pathway in animal pathogenic parasites, we cultured bloodstream *T. b. brucei* Antat 1.1 parasites in presence of ergosterol plus different concentrations of posaconazole. It

Table 1. *In vitro* killing activity of selected drugs on animal virulent strains (IC₅₀). Each strain was incubated in complete RPMI culture medium containing different concentration of drugs. The concentration that inhibited parasite growth by 50% (IC₅₀ μM) was determined after 24 hours of incubation.

	<i>T. b. brucei</i> Antat 1.1	<i>T. b. gambiense</i> Biyamina	<i>T. b. gambiense</i> Feo
Posaconazole	2.7 ± 1.1	0.12 ± 0.01	1.6 ± 0.2
Nifurtimox	1.7 ± 0.5	0.08 ± 0.01	0.8 ± 0.1
Eflornithine	33.3 ± 7.9	25.0 ± 2.6	20.8 ± 2.2
Pentamidine	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.06	0.05 ± 0.01

Each result is the mean ± sem, from 3 independent experiments

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.t001

was observed that ergosterol reversed the effect of posaconazole, when using posaconazole at the IC₅₀ (2.5 μM) and IC₉₀ (5 μM) concentrations (Fig 5A and 5B).

The posaconazole-eflornithine combination (PECT) is an alternative to NECT in a mouse model

A preliminary experiment with the *T. b. brucei* Antat 1.1 strain, with increasing doses of posaconazole, (5, 10, 20 or 50 mg/kg/day given in two doses and with 12 hours between each dose), was performed to determine an effective dose. All mice developed an infection and those that died had high parasitemia (>10⁶/mL). The mice treated with 20 mg/kg/day twice a day had significantly prolonged survival than controls ($p = 0.008$). This latter dose was retained as effective and used for the following experiments.

We next determined the survival rates of mice infected with *T. b. brucei* Antat 1.1 (Fig 6A), *T. b. gambiense* Biyamina (Fig 6B) and *T. b. gambiense* Feo (Fig 6C), and subjected them to NECT treatment (nifurtimox+eflornithine), eflornithine, posaconazole, and PECT treatment (posaconazole+eflornithine). For each of these three experiments, the over-all log rank test showed a difference between the set of curves ($p < 10^{-4}$). *T. b. brucei* Antat 1.1 mice treated with posaconazole or mice treated with eflornithine showed improved survival compared to controls ($n = 12$ in each group; log rank $p = 0.008$ and $p = 0.001$, respectively). The PECT and NECT groups showed improved survival compared to controls ($p = 0.001$) but not compared to eflornithine group ($p = 0.4$). There was no significant difference between the survival with PECT and NECT ($p = 0.97$). With regards to *T. b. gambiense* Biyamina, the PECT and NECT groups showed improved survival compared to the posaconazole treated group and to controls ($n = 12$ in each group; log rank: $p < 10^{-4}$). Moreover, the PECT and NECT groups showed improved survival compared to eflornithine group ($p = 0.003$ and $p = 0.01$, respectively). The survival was globally better with PECT than with NECT, with eight out of twelve, and five out of twelve mice cured, respectively. Nevertheless, the difference between PECT and NECT groups was not statistically significant (log rank: $p = 0.14$). Pertaining to *T. b. gambiense* Feo, the PECT and NECT groups showed improved survival compared to the posaconazole treated group and to controls ($n = 8$ in each group; log rank: $p < 10^{-4}$). PECT and NECT groups showed improved survival compared to eflornithine group ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively). Seven out of eight, and six out of eight mice were cured with PECT and NECT combinations respectively, without any significant statistical difference (log rank: $p = 0.48$).

Discussion

Our study demonstrates the essentiality of CYP51 in *T. brucei*, using a tetracycline-inducible RNAi system. We observed morphological defects with multflagellated cells, and cytokinesis

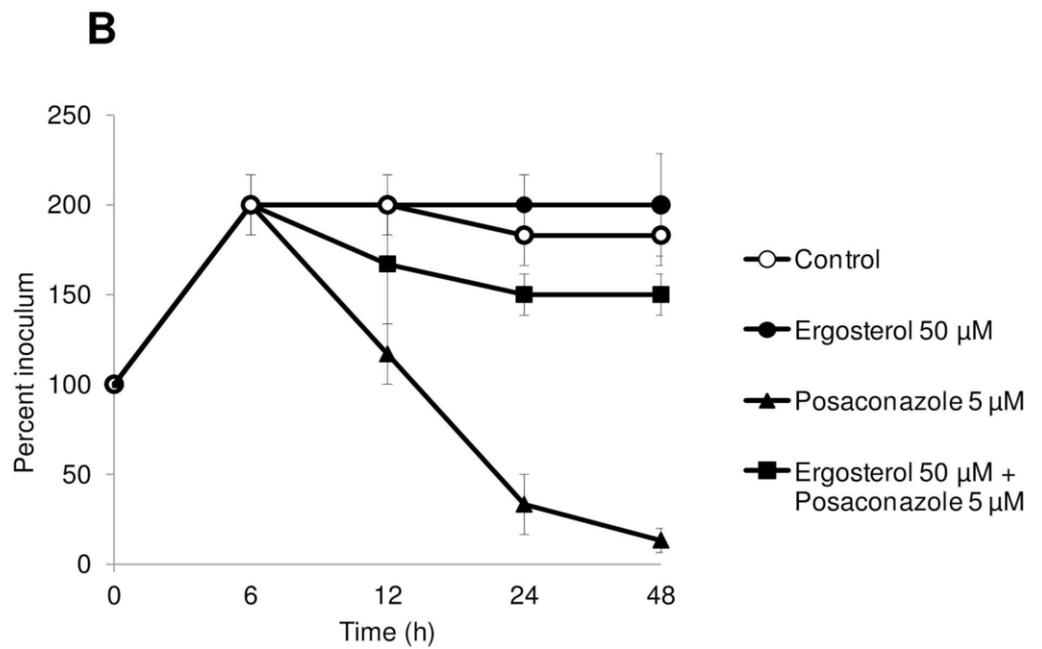
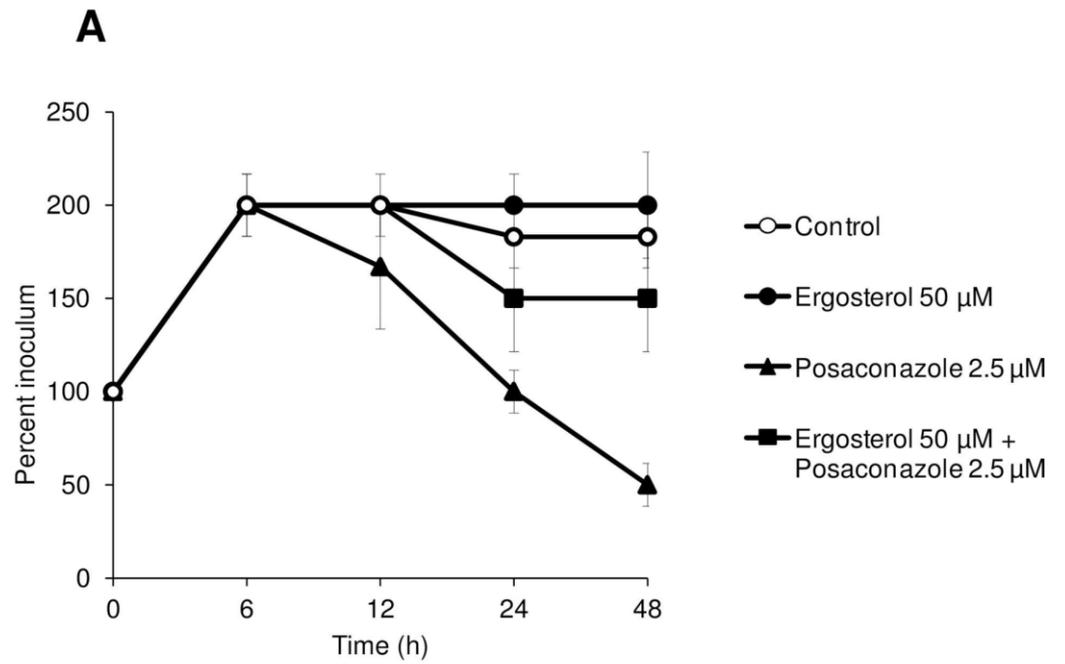


Fig 5. Reversing the effect of posaconazole using ergosterol. Posaconazole was tested at 2.5 μM (A) and 5 μM (B). *T. brucei* Antat 1.1 BSF parasites were inoculated at 5.0×10^5 cells/mL and incubated in complete RPMI medium in absence or in presence of posaconazole at 2.5 μM (A) or 5 μM (B), ergosterol (50 μM), or a combination of ergosterol 50 μM + posaconazole (2.5 μM in A, 5 μM in B) for 48 hours. Cell survival was assessed at 6, 12, 24, 48 hours of incubation and cell number was calculated and expressed graphically as a percentage of the initial inoculum. Error bars represent the standard error to the mean (sem) from 4 independent experiments.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g005

dysfunction, which are phenotypes often observed when the function of important proteins is perturbed or knocked down in bloodstream forms. Moreover, by testing the effects of posaconazole on CYP51^{RNAi} cells and on virulent animal strains, we observed that this drug has an anti-trypanosomal activity, probably connected with a mechanism of action targeting CYP51. Importantly, the effect of posaconazole at 20 mg/kg combined with eflornithine (PECT) was similar to NECT combination in infected-mice.

CYP51 enzymes are found in all biological kingdoms and have been joined into one cytochrome P450 family (CYP51) because of their strict functional conservation, despite their low amino acid sequence identity, ranging from 22 to 27% across phylogeny [57]. Among the *Trypanosomatidae*, the essentiality of CYP51 has been demonstrated for *Leishmania donovani* [11] and *Leishmania major* [58]. In the latter study, CYP51-null mutants were viable but show defects in growth rate, cytokinesis defects and hypersensitivity to heat stress. We observed that 53.7% of 5-days CYP51^{RNAi} induced *T. brucei* were multiflagellated, whereas only 5.8% of parental parasites presented this abnormality. Moreover, in our work, cell growth was reduced in CYP51^{RNAi} induced cells compared to WT with cell growth arrest after 12 days, followed by death after 14 days. These observations are in line with the progressive slow decrease in CYP51 expression that we measured by Western blot and that could be explained by a long half-life of this protein. Cell death occurred in our study when CYP51 expression level approaches 50% of the value of WT cells. These results differ from those of Mc Call *et al.* in 2015 who found that *L. donovani* parasites were able to tolerate > 50% reduction in CYP51 protein levels with no apparent effects on parasite phenotype [11]. These authors finally confirmed essentiality of CYP51 in *Leishmania* by obtaining complete loss of chromosomal CYP51 genes only in the presence of an episomal source of CYP51.

We endeavored, without success, to identify the sub-cellular localization of the protein, using *in situ* tagging of CYP51 and expressing this in trypanosomes as described in [59]. Interestingly, the addition of the tag was probably lethal because no transformed clones were obtained despite repeated transformations, and all transfected cultures died. Therefore, our results show that CYP51 is indispensable in *T. brucei* bloodstream form. Knockdown of CYP51 induced the common and “archetypal” secondary or downstream effects observed in bloodstream forms including modulation of cell cycle and cell division.

It is rather surprising that CYP51^{RNAi} induced cells are less sensitive to posaconazole than WT cells. Indeed, logic would suggest that when the level of CYP51 is reduced during RNAi induction, the remaining proteins should be targeted by posaconazole, resulting in more rapid death. Interestingly, it has been previously reported quite similar results with CYP51-null mutants of *Leishmania major*, which show increased resistance to itraconazole and amphotericin B [58]. Some hypotheses could explain our observations. First, *T. brucei* might be less sensitive because there is little or no target for the drug to bind and block, which could limit the effect of the drug. Secondly, the morphologic changes in cell shape after knockdown could be associated with a diminution in drug uptake. Thirdly, knockdown of CYP51 may induce the accumulation of compensatory substrates or enzymes whose activity prevent or reduce the effect of posaconazole. For instance, it has been hypothesized that, during CYP51 knockdown in *Leishmania*, 14-methylfecosterol and 14-methylzymosterol could partially compensate the

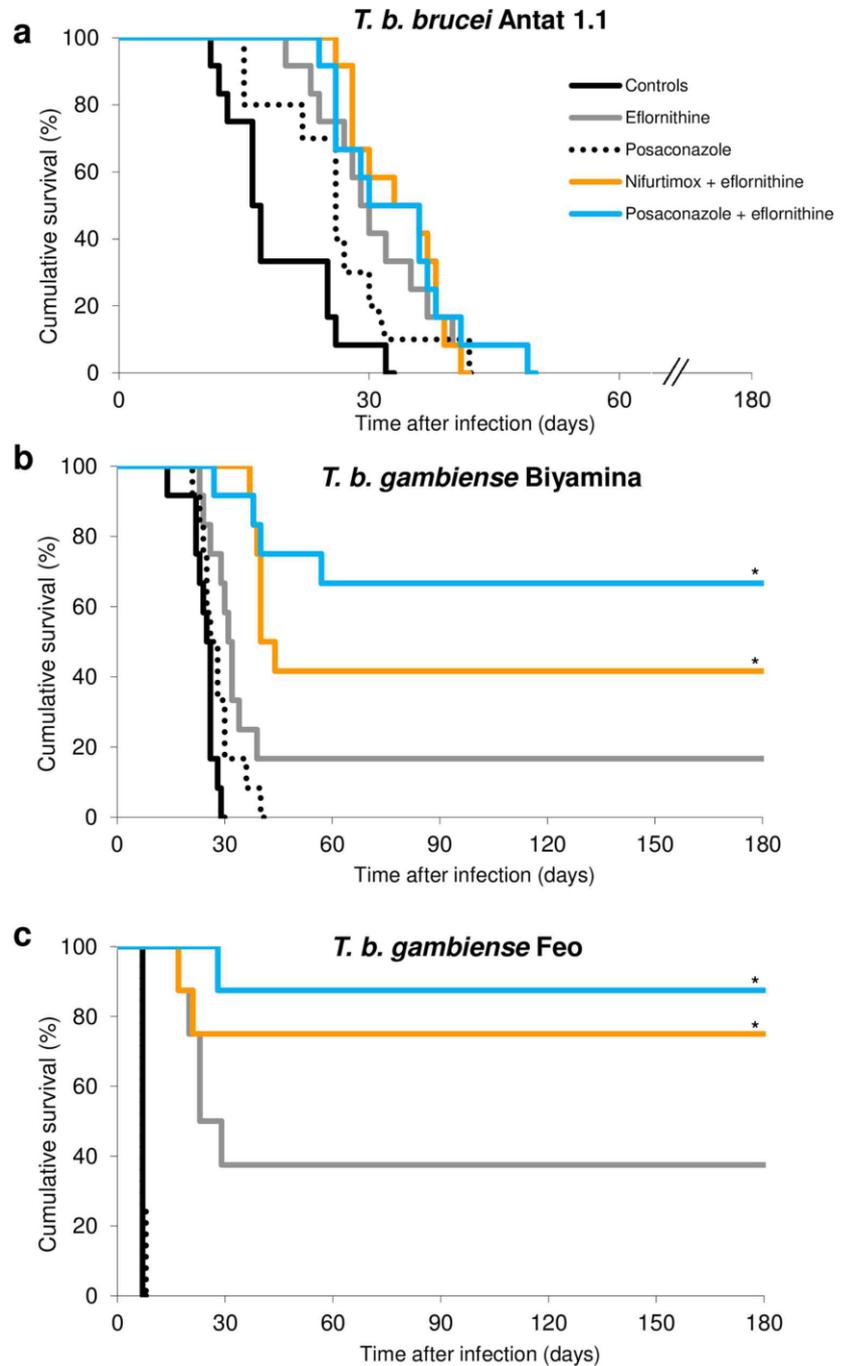


Fig 6. The posaconazole-eflornithine combination (PECT) is an alternative to NECT in a mouse model. Survival curves using the combinations of drugs for mice infected with *T. b. brucei* Antat 1.1 (Fig 6a),

T. b. gambiense Biyamina (Fig 6b) and *T. b. gambiense* Feo (Fig 6c). Treatments were started at day five post-inoculation. Nifurtimox and posaconazole were administered at 20 mg/kg/day twice a day by oral gavage and eflornithine at 3.2 g/kg in the drinking water. Animals were followed for survival or relapse until day 180. The *T. b. brucei* Antat 1.1, PECT and NECT groups showed improved survival compared to controls ($p = 0.001$). With regards to *T. b. gambiense* Biyamina, the PECT and NECT groups showed improved survival compared to controls ($p < 10^{-4}$) and to eflornithine group ($p = 0.003$ and $p = 0.01$, respectively). *T. b. gambiense* Feo, the PECT and NECT groups showed improved survival compared to controls ($p < 10^{-4}$) and to eflornithine group ($p = 0.02$ and $p = 0.03$, respectively). *Significant $p < 0.05$ compared to controls and to eflornithine group.

doi:10.1371/journal.pntd.0005125.g006

loss of ergostane-based sterol and that other membrane lipids (sphingolipids, glycerophospholipids, and cholesterol) may also help stabilize the plasma membrane [58]. A combination of more than one of the above mentioned hypotheses could also influence drug efficacy in induced RNAi cells.

We aimed to evaluate the reversibility of the effect of CYP51 RNAi and of posaconazole on trypanosomes cell growth and cell survival using ergosterol, as previously proposed by some authors in fungi [49]. We observed reversibility of phenotype in CYP51^{RNAi} knockdown cells treated with ergosterol, confirming that the mechanism of action of posaconazole is dependent on the sterol biosynthesis pathway in trypanosomes. This result is strengthened by our data showing that CYP51^{RNAi} in mice reduces parasite virulence. Whereas the RNAi study tends to validate CYP51 as the target for posaconazole, we cannot, however, exclude a pleiotropic effect on this pathway. Therefore, further studies need to be performed to evaluate the sterol composition of CYP51^{RNAi} induced *T. brucei* cells or their infectivity in mice.

Different approaches have been previously attempted to target sterol pathway in trypanosomes. Inhibitors of squalene synthase have shown anti-trypanosomal activity against *T. b. rhodesiense* bloodstream forms *in vitro* [60]. Different enzyme inhibitors targeting CYP51 and C24-methyltransferase have also been identified [18,61–63]. Posaconazole is a potent inhibitor of the Cyp450-dependent lanosterol 14 α -demethylase in yeasts and molds [64,65]. It was shown to be active against *Leishmania* [27,28] or *Trypanosoma cruzi* [29] in murine hosts. Due to the limits of *in vitro* *T. gambiense* cultures, our approach has been to complete *in vitro* drug testing by a mouse model. In mammals, numerous factors interact such as immune characteristics of the host, drugs pharmacokinetics, disease stage and timing of treatment. Various models have been proposed to study acute or late trypanosome infections [4,34,35,66,67]. For our studies, we used a panel of three well characterized strains. In our model, *T. b. gambiense* Feo induces an acute form of trypanosomiasis, whereas *T. b. gambiense* Biyamina and *T. b. brucei* Antat 1.1 induce infection evolving during 3 to 4 weeks followed by animal death. *T. b. brucei* Antat 1.1 penetration into the brain parenchyma have been extensively studied [34,35]. Nevertheless, both the *T. b. Biyamina* and *T. b. Feo* strains belong to group 2 *gambiense*, which can be seen as a limitation if potential reservoirs are not considered. In our study, when used alone, posaconazole effect was significant, although limited, in prolonging animal survival ($p = 0.008$). When combining with eflornithine, cure rates were close to those of NECT treatment and were variable depending on the strain (0.0%, 68.0% and 88.0% for *T. b. brucei* Antat 1.1, *T. b. Biyamina* and *T. b. Feo*, respectively). Of note, mice infected with the *T. brucei* Antat 1.1 strain died faster, which was correlated with higher IC₅₀ *in vitro*. We have not performed assays of drug concentrations in serum or the brain of animals. This prevents the development of conclusions regarding the effects of these drug combinations during the course of more prolonged or more severe infections. The results observed *in vitro* and in animal models could however be seen as complementary. In our study, both approaches showed anti-trypanosomal activity of posaconazole.

Posaconazole has proved to be safe and efficacious as antifungal treatment, included in immunocompromised patients [68] and when used at high dosage [69]. Posaconazole is an inhibitor of Cyp 3A4 enzyme but does not serve as a substrate, and thus has a moderate propensity for drug-drug interactions [70]. It was initially developed as an oral suspension that has shown limitations with respect to fasting state absorption [71,72]. A more recently approved delayed-release oral tablet could reduce inter-patient variability and can be taken once daily without the need for food intake to support adequate absorption [73,74]. Data concerning posaconazole diffusion into the brain are limited [75,76], although efficacy when treating invasive cerebral fungal infections have been reported in murine models [77] and clinical cases reports, suggesting that it crosses the blood brain barrier in sufficient quantities to treat cerebral fungal infection and thus possibly treat late stage sleeping sickness [78–80]. The recent results in a phase II clinical trial with posaconazole for Chagas disease have been disappointing [81]. In that trial, posaconazole was proposed as a monotherapy. While the parasitemia dropped below detection limit after treatment, it was observed that 10 months later more patients in the posaconazole groups had treatment failure during follow-up than in the comparative benznidazole group. Thereafter, some authors have proposed not to abandon the triazoles during Chagas disease but to find a suitable partner for combination therapy [82]. Our results suggest that this approach could be considered for HAT with an eflornithine-based combination. Indeed, posaconazole is considered as well tolerated unlike nifurtimox, which has a significant toxicity, particularly when used alone in high doses [83]. Thus, posaconazole-eflornithine combination (PECT) could be considered as a potential alternative to arsenical treatment for trypanosomiasis with, compared to NECT, expected improved tolerance. Additional research should be performed to determine potential combinations with other drugs currently under investigation in HAT such as fexinidazole [84,85] or oxaboroles [86]. Further research should also be conducted to identify new molecules that target more specifically trypanosome CYP51 with enhanced affinity to the enzyme in order to improve the efficiency in combination [87].

Supporting Information

S1 Table. Genotype characterization of the *T. b. gambiense* Feo strain.

(DOCX)

S1 References. Supporting Information References.

(DOCX)

S1 Text. Genotype characterization of *T.b. gambiense* Feo strain.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank all members of the Robinson laboratory for discussions, Professor Michel Dupon and Professor Denis Malvy (University Hospital of Bordeaux) for their help during the study. We thank Dr Sylvie Lawson-Ayayi (ISPED, Centre INSERM U897-Epidémiologie-Biostatistique) for the help with statistical analysis. We thank Patricia Nabos for technical assistance. We are grateful to Mr Nicolas Biteau for providing primers and DNA of *T. b. gambiense* strains for microsatellite and minisatellite analysis. We are grateful to Dr. James H. McKerrow (University of California San Diego, U.S.A) for giving primary antibody anti-CYP51, to Professor. Keith Gull (University of Oxford, U.K.) for the anti-PFR2 antibody, and to Professor. Paul Michels (University of Edinburgh, U.K.) for the anti-GAPDH antibody. We thank Dr. Péré

Perez Simarro and Jose Ramon Franco (World Health Organization) for the supply of eflornithine and nifurtimox.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FAD MB DD SD PV DRR.

Performed the experiments: FAD MB DD PC NL FL.

Analyzed the data: FAD MB PV DRR.

Contributed reagents/materials/analysis tools: PV DRR.

Wrote the paper: FAD MB PV DRR.

References

1. Malvy D, Chappuis F (2011) Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect* 17: 986–995. doi: [10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x) PMID: [21722252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21722252/)
2. Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, et al. (2009) Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 374: 56–64. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)61117-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61117-X) PMID: [19559476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19559476/)
3. Alirol E, Schrupf D, Amici Heradi J, Riedel A, de Patoul C, et al. (2013) Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Medecins Sans Frontieres experience in the Democratic Republic of the Congo. *Clin Infect Dis* 56: 195–203. doi: [10.1093/cid/cis886](https://doi.org/10.1093/cid/cis886) PMID: [23074318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23074318/)
4. Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A (1980) Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 210: 332–334. PMID: [6775372](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6775372/)
5. Nightingale SL (1991) From the Food and Drug Administration. *JAMA* 265: 1229. PMID: [1995961](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1995961/)
6. Jennings FW (1990) Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 2. Combination chemotherapy and African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 618–621. PMID: [2278054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2278054/)
7. Hall BS, Bot C, Wilkinson SR (2011) Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem* 286: 13088–13095. doi: [10.1074/jbc.M111.230847](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847) PMID: [21345801](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21345801/)
8. Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combesure C, et al. (2010) Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis* 51: e69–75. doi: [10.1086/656917](https://doi.org/10.1086/656917) PMID: [20932171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20932171/)
9. Lepesheva GI, Waterman MR (2011) Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. *Curr Top Med Chem* 11: 2060–2071. PMID: [21619513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21619513/)
10. de Souza W, Rodrigues JC (2009) Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 642502. doi: [10.1155/2009/642502](https://doi.org/10.1155/2009/642502) PMID: [19680554](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19680554/)
11. McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G, et al. (2015) Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003588. doi: [10.1371/journal.pntd.0003588](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003588) PMID: [25768284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25768284/)
12. Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ (1988) Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 6753–6757. PMID: [3413122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3413122/)
13. Zhou W, Cross GA, Nes WD (2007) Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *J Lipid Res* 48: 665–673. doi: [10.1194/jlr.M600404-JLR200](https://doi.org/10.1194/jlr.M600404-JLR200) PMID: [17127773](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17127773/)
14. Nes CR, Singha UK, Liu J, Ganapathy K, Villalta F, et al. (2012) Novel sterol metabolic network of *Trypanosoma brucei* procyclic and bloodstream forms. *Biochem J* 443: 267–277. doi: [10.1042/BJ20111849](https://doi.org/10.1042/BJ20111849) PMID: [22176028](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22176028/)
15. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, et al. (2003) Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 126: 129–142. PMID: [12615312](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12615312/)

16. Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, et al. (2011) High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res* 21: 915–924. doi: [10.1101/gr.115089.110](https://doi.org/10.1101/gr.115089.110) PMID: [21363968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21363968/)
17. Perez-Moreno G, Sealey-Cardona M, Rodrigues-Poveda C, Gelb MH, Ruiz-Perez LM, et al. (2012) Endogenous sterol biosynthesis is important for mitochondrial function and cell morphology in procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* 42: 975–989. doi: [10.1016/j.ijpara.2012.07.012](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.07.012) PMID: [22964455](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22964455/)
18. Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, et al. (2007) Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. *Chem Biol* 14: 1283–1293. doi: [10.1016/j.chembiol.2007.10.011](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.10.011) PMID: [18022567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18022567/)
19. Raad II, Hachem RY, Herbrecht R, Graybill JR, Hare R, et al. (2006) Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin Infect Dis* 42: 1398–1403. doi: [10.1086/503425](https://doi.org/10.1086/503425) PMID: [16619151](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16619151/)
20. Walsh TJ, Raad I, Patterson TF, Chandrasekar P, Donowitz GR, et al. (2007) Treatment of invasive aspergillosis with posaconazole in patients who are refractory to or intolerant of conventional therapy: an externally controlled trial. *Clin Infect Dis* 44: 2–12. doi: [10.1086/508774](https://doi.org/10.1086/508774) PMID: [17143808](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17143808/)
21. Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, et al. (2007) Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 356: 348–359. doi: [10.1056/NEJMoa061094](https://doi.org/10.1056/NEJMoa061094) PMID: [17251531](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251531/)
22. Ullmann AJ, Lipton JH, Vesole DH, Chandrasekar P, Langston A, et al. (2007) Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 356: 335–347. doi: [10.1056/NEJMoa061098](https://doi.org/10.1056/NEJMoa061098) PMID: [17251530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17251530/)
23. Torres HA, Hachem RY, Chemaly RF, Kontoyiannis DP, Raad II (2005) Posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal. *Lancet Infect Dis* 5: 775–785. doi: [10.1016/S1473-3099\(05\)70297-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70297-8) PMID: [16310149](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16310149/)
24. Aperis G, Mylonakis E (2006) Newer triazole antifungal agents: pharmacology, spectrum, clinical efficacy and limitations. *Expert Opin Investig Drugs* 15: 579–602. doi: [10.1517/13543784.15.6.579](https://doi.org/10.1517/13543784.15.6.579) PMID: [16732713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16732713/)
25. Lepesheva GI, Park HW, Hargrove TY, Vanhollebeke B, Wawrzak Z, et al. (2010) Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14alpha-demethylase and implications for selective treatment of human infections. *J Biol Chem* 285: 1773–1780. doi: [10.1074/jbc.M109.067470](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067470) PMID: [19923211](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19923211/)
26. Chen CK, Leung SS, Guilbert C, Jacobson MP, McKerrow JH, et al. (2010) Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e651. doi: [10.1371/journal.pntd.0000651](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000651) PMID: [20386598](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20386598/)
27. de Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC (2013) In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 8: e83247. doi: [10.1371/journal.pone.0083247](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083247) PMID: [24376670](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24376670/)
28. Al-Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC (1999) Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2910–2914. PMID: [10582881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10582881/)
29. Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, et al. (2000) Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 150–155. PMID: [10602737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10602737/)
30. Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 99: 89–101. PMID: [10215027](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10215027/)
31. Hirumi H, Hirumi K (1989) Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *J Parasitol* 75: 985–989. PMID: [2614608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2614608/)
32. Vincendeau P, Daulouede S, Veyret B, Darde ML, Bouteille B, et al. (1992) Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Exp Parasitol* 75: 353–360. PMID: [1426137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1426137/)
33. Geiger A, Hirtz C, Becue T, Bellard E, Centeno D, et al. (2010) Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol* 10: 20. doi: [10.1186/1471-2180-10-20](https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-20) PMID: [20102621](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20102621/)
34. Masocha W, Robertson B, Rottenberg ME, Mhlanga J, Sorokin L, et al. (2004) Cerebral vessel laminins and IFN-gamma define *Trypanosoma brucei* penetration of the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 114: 689–694. doi: [10.1172/JCI22104](https://doi.org/10.1172/JCI22104) PMID: [15343387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15343387/)

35. Masocha W, Rottenberg ME, Kristensson K (2006) Minocycline impedes African trypanosome invasion of the brain in a murine model. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 1798–1804. doi: [10.1128/AAC.50.5.1798-1804.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1798-1804.2006) PMID: [16641452](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16641452/)
36. Mathieu-Daude F, Bicart-See A, Bosseno MF, Breniere SF, Tibayrenc M (1994) Identification of *Trypanosoma brucei* gambiense group I by a specific kinetoplast DNA probe. *Am J Trop Med Hyg* 50: 13–19. PMID: [8304568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8304568/)
37. Clayton CE, Fueri JP, Itzhaki JE, Bellofatto V, Sherman DR, et al. (1990) Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 10: 3036–3047. PMID: [2342468](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2342468/)
38. Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T (2000) Characterization of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol Biochem Parasitol* 105: 187–202. PMID: [10745102](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10745102/)
39. Giroud C, Ottonnes F, Coustou V, Dacheux D, Biteau N, et al. (2009) Murine Models for *Trypanosoma brucei* gambiense disease progression—from silent to chronic infections and early brain tropism. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e509. doi: [10.1371/journal.pntd.0000509](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000509) PMID: [19721701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19721701/)
40. Ngo H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14687–14692. PMID: [9843950](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9843950/)
41. Wirtz E, Clayton C (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. *Science* 268: 1179–1183. PMID: [7761835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7761835/)
42. Biebinger S, Wirtz LE, Lorenz P, Clayton C (1997) Vectors for inducible expression of toxic gene products in bloodstream and procyclic *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 85: 99–112. PMID: [9108552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9108552/)
43. Aslett M, Aurrecochea C, Berriman M, Brestelli J, Brunk BP, et al. (2010) TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res* 38: D457–462. doi: [10.1093/nar/gkp851](https://doi.org/10.1093/nar/gkp851) PMID: [19843604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19843604/)
44. LaCount DJ, Barrett B, Donelson JE (2002) *Trypanosoma brucei* FLA1 is required for flagellum attachment and cytokinesis. *J Biol Chem* 277: 17580–17588. doi: [10.1074/jbc.M200873200](https://doi.org/10.1074/jbc.M200873200) PMID: [11877446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11877446/)
45. Schumann Burkard G, Jutzi P, Roditi I (2011) Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. *Mol Biochem Parasitol* 175: 91–94. doi: [10.1016/j.molbiopara.2010.09.002](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.002) PMID: [20851719](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851719/)
46. Lanham SM, Godfrey DG (1970) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol* 28: 521–534. PMID: [4993889](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4993889/)
47. Albright JW, Albright JF (1980) In vitro growth of *Trypanosoma muscui* in cell-free medium conditioned by rodent macrophages and mercaptoethanol. *Int J Parasitol* 10: 137–142. PMID: [7372396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7372396/)
48. Pomel S, Biot C, Bories C, Loiseau PM (2013) Antiprotozoal activity of ferroquine. *Parasitol Res* 112: 665–669. doi: [10.1007/s00436-012-3183-4](https://doi.org/10.1007/s00436-012-3183-4) PMID: [23229318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23229318/)
49. Zhang YQ, Gamarra S, Garcia-Effron G, Park S, Perlin DS, et al. (2010) Requirement for ergosterol in V-ATPase function underlies antifungal activity of azole drugs. *PLoS Pathog* 6: e1000939. doi: [10.1371/journal.ppat.1000939](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000939) PMID: [20532216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20532216/)
50. Lander N, Ulrich PN, Docampo R (2013) *Trypanosoma brucei* vacuolar transporter chaperone 4 (TbVtc4) is an acidocalcisome polyphosphate kinase required for in vivo infection. *J Biol Chem* 288: 34205–34216. doi: [10.1074/jbc.M113.518993](https://doi.org/10.1074/jbc.M113.518993) PMID: [24114837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24114837/)
51. Bacchi CJ, Nathan HC, Yarlott N, Goldberg B, McCann PP, et al. (1994) Combination chemotherapy of drug-resistant *Trypanosoma brucei* rhodesiense infections in mice using DL-alpha-difluoromethylornithine and standard trypanocides. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 563–569. PMID: [8203855](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8203855/)
52. Herbert WJ, Lumsden WH (1976) *Trypanosoma brucei*: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia. *Exp Parasitol* 40: 427–431. PMID: [976425](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/976425/)
53. Yu X, Nandekar P, Mustafa G, Cojocar V, Lepesheva GI, et al. (2016) Ligand tunnels in T. brucei and human CYP51: Insights for parasite-specific drug design. *Biochim Biophys Acta* 1860: 67–78. doi: [10.1016/j.bbagen.2015.10.015](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.10.015) PMID: [26493722](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26493722/)
54. De Vita D, Moraca F, Zamperini C, Pandolfi F, Di Santo R, et al. (2016) In vitro screening of 2-(1H-imidazol-1-yl)-1-phenylethanol derivatives as antiprotozoal agents and docking studies on *Trypanosoma cruzi* CYP51. *Eur J Med Chem* 113: 28–33. doi: [10.1016/j.ejmech.2016.02.028](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.02.028) PMID: [26922226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26922226/)
55. Bastin P, Sherwin T, Gull K (1998) Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 391: 548. doi: [10.1038/35300](https://doi.org/10.1038/35300) PMID: [9468133](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9468133/)
56. Miranda-Novales G, Leanos-Miranda BE, Vilchis-Perez M, Solorzano-Santos F (2006) In vitro activity effects of combinations of cephalothin, dicloxacillin, imipenem, vancomycin and amikacin against methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. strains. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 25. doi: [10.1186/1476-0711-5-25](https://doi.org/10.1186/1476-0711-5-25) PMID: [17034644](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17034644/)

57. Lepesheva GI, Waterman MR (2007) Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta* 1770: 467–477. doi: [10.1016/j.bbagen.2006.07.018](https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2006.07.018) PMID: [16963187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16963187/)
58. Xu W, Hsu FF, Baykal E, Huang J, Zhang K (2014) Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in leishmania. *PLoS Pathog* 10: e1004427. doi: [10.1371/journal.ppat.1004427](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004427) PMID: [25340392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25340392/)
59. Oberholzer M, Morand S, Kunz S, Seebeck T (2006) A vector series for rapid PCR-mediated C-terminal in situ tagging of Trypanosoma brucei genes. *Mol Biochem Parasitol* 145: 117–120. doi: [10.1016/j.molbiopara.2005.09.002](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.09.002) PMID: [16269191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16269191/)
60. Cammerer SB, Jimenez C, Jones S, Gros L, Lorente SO, et al. (2007) Quinclidine derivatives as potential antiparasitics. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 4049–4061. doi: [10.1128/AAC.00205-07](https://doi.org/10.1128/AAC.00205-07) PMID: [17709461](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17709461/)
61. Leaver DJ, Patkar P, Singha UK, Miller MB, Haubrich BA, et al. (2015) Fluorinated Sterols Are Suicide Inhibitors of Ergosterol Biosynthesis and Growth in Trypanosoma brucei. *Chem Biol* 22: 1374–1383. doi: [10.1016/j.chembiol.2015.08.017](https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.08.017) PMID: [26496686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26496686/)
62. Hargrove TY, Wawrzak Z, Liu J, Waterman MR, Nes WD, et al. (2012) Structural complex of sterol 14alpha-demethylase (CYP51) with 14alpha-methylenecyclopropyl-Delta7-24, 25-dihydrolanosterol. *J Lipid Res* 53: 311–320. doi: [10.1194/jlr.M021865](https://doi.org/10.1194/jlr.M021865) PMID: [22135275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22135275/)
63. Konkle ME, Hargrove TY, Kleshchenko YY, von Kries JP, Ridenour W, et al. (2009) Indomethacin amides as a novel molecular scaffold for targeting Trypanosoma cruzi sterol 14alpha-demethylase. *J Med Chem* 52: 2846–2853. doi: [10.1021/jm801643b](https://doi.org/10.1021/jm801643b) PMID: [19354253](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19354253/)
64. Nagappan V, Deresinski S (2007) Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. *Clin Infect Dis* 45: 1610–1617. doi: [10.1086/523576](https://doi.org/10.1086/523576) PMID: [18190324](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18190324/)
65. Munayyer HK, Mann PA, Chau AS, Yarosh-Tomaine T, Greene JR, et al. (2004) Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14alpha-demethylation in yeasts and molds. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3690–3696. doi: [10.1128/AAC.48.10.3690-3696.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3690-3696.2004) PMID: [15388421](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15388421/)
66. Burrell-Saward H, Rodgers J, Bradley B, Croft SL, Ward TH (2015) A sensitive and reproducible in vivo imaging mouse model for evaluation of drugs against late-stage human African trypanosomiasis. *J Antimicrob Chemother* 70: 510–517. doi: [10.1093/jac/dku393](https://doi.org/10.1093/jac/dku393) PMID: [25298516](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25298516/)
67. Myburgh E, Coles JA, Ritchie R, Kennedy PG, McLatchie AP, et al. (2013) In vivo imaging of trypanosome-brain interactions and development of a rapid screening test for drugs against CNS stage trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis* 7: e2384. doi: [10.1371/journal.pntd.0002384](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002384) PMID: [23991236](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23991236/)
68. Heinz WJ, Egerer G, Lellek H, Boehme A, Greiner J (2013) Posaconazole after previous antifungal therapy with voriconazole for therapy of invasive aspergillus disease, a retrospective analysis. *Mycoses* 56: 304–310. doi: [10.1111/myc.12023](https://doi.org/10.1111/myc.12023) PMID: [23170837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23170837/)
69. Bernardo VA, Cross SJ, Crews KR, Flynn PM, Hoffman JM, et al. (2013) Posaconazole therapeutic drug monitoring in pediatric patients and young adults with cancer. *Ann Pharmacother* 47: 976–983. doi: [10.1345/aph.1R775](https://doi.org/10.1345/aph.1R775) PMID: [23737511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23737511/)
70. Saad AH, DePestel DD, Carver PL (2006) Factors influencing the magnitude and clinical significance of drug interactions between azole antifungals and select immunosuppressants. *Pharmacotherapy* 26: 1730–1744. doi: [10.1592/phco.26.12.1730](https://doi.org/10.1592/phco.26.12.1730) PMID: [17125435](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17125435/)
71. Ezzet F, Wexler D, Courtney R, Krishna G, Lim J, et al. (2005) Oral bioavailability of posaconazole in fasted healthy subjects: comparison between three regimens and basis for clinical dosage recommendations. *Clin Pharmacokinet* 44: 211–220. doi: [10.2165/00003088-200544020-00006](https://doi.org/10.2165/00003088-200544020-00006) PMID: [15656699](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15656699/)
72. Krishna G, Moton A, Ma L, Medlock MM, McLeod J (2009) Pharmacokinetics and absorption of posaconazole oral suspension under various gastric conditions in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 958–966. doi: [10.1128/AAC.01034-08](https://doi.org/10.1128/AAC.01034-08) PMID: [19075045](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19075045/)
73. Durani U, Tosh PK, Barreto JN, Estes LL, Jannetto PJ, et al. (2015) Retrospective Comparison of Posaconazole Levels in Patients Taking the Delayed-Release Tablet versus the Oral Suspension. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 4914–4918. doi: [10.1128/AAC.00496-15](https://doi.org/10.1128/AAC.00496-15) PMID: [26055378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26055378/)
74. Kersemaekers WM, Dogterom P, Xu J, Marcantonio EE, de Greef R, et al. (2015) Effect of a high-fat meal on the pharmacokinetics of 300-milligram posaconazole in a solid oral tablet formulation. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 3385–3389. doi: [10.1128/AAC.05000-14](https://doi.org/10.1128/AAC.05000-14) PMID: [25824210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25824210/)
75. Blennow O, Eliasson E, Pettersson T, Pohanka A, Szakos A, et al. (2014) Posaconazole concentrations in human tissues after allogeneic stem cell transplantation. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 4941–4943. doi: [10.1128/AAC.03252-14](https://doi.org/10.1128/AAC.03252-14) PMID: [24890587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24890587/)
76. Lelievre B, Legras P, Godon C, Franconi F, Saint-Andre JP, et al. (2013) Experimental models of disseminated scedosporiosis with cerebral involvement. *J Pharmacol Exp Ther* 345: 198–205. doi: [10.1124/jpet.112.201541](https://doi.org/10.1124/jpet.112.201541) PMID: [23426955](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23426955/)

77. Imai JK, Singh G, Clemons KV, Stevens DA (2004) Efficacy of posaconazole in a murine model of central nervous system aspergillosis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4063–4066. doi: [10.1128/AAC.48.10.4063-4066.2004](https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.4063-4066.2004) PMID: [15388482](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15388482/)
78. Egelund EF, Egelund TA, Ng JS, Wassil SK, Peloquin CA (2013) Posaconazole pharmacokinetics in a 2-year-old boy with rhino-cerebral-orbital zygomycosis. *Pharmacotherapy* 33: e1–8. doi: [10.1002/phar.1172](https://doi.org/10.1002/phar.1172) PMID: [23307552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23307552/)
79. Ellenbogen JR, Waqar M, Denning DW, Cooke RP, Skinner DW, et al. (2014) Posaconazole responsive cerebral aspergillosis in an immunocompetent adult. *J Clin Neurosci* 21: 1825–1827. doi: [10.1016/j.jocn.2014.05.004](https://doi.org/10.1016/j.jocn.2014.05.004) PMID: [24938388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24938388/)
80. Patel MS, Wright AJ, Kohn R, Markmann JF, Kotton CN, et al. (2015) Successful long-term management of invasive cerebral fungal infection following liver transplantation. *Mycoses* 58: 181–186. doi: [10.1111/myc.12289](https://doi.org/10.1111/myc.12289) PMID: [25590987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25590987/)
81. Molina I, Gomez I Prat J, Salvador F, Trevino B, Sulleiro E, et al. (2014) Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 370: 1899–1908. doi: [10.1056/NEJMoa1313122](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122) PMID: [24827034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827034/)
82. Fugl MA, Kaiser M, Tanner M, Schneider R, Maser P, et al. (2015) Match-making for posaconazole through systems thinking. *Trends Parasitol* 31: 46–51. doi: [10.1016/j.pt.2014.11.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.004) PMID: [25486978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25486978/)
83. Pepin J, Milord F, Meurice F, Ethier L, Loko L, et al. (1992) High-dose nifurtimox for arseno-resistant *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness: an open trial in central Zaire. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 254–256. PMID: [1412646](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1412646/)
84. Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, et al. (2010) Fexinidazole—a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e923. doi: [10.1371/journal.pntd.0000923](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923) PMID: [21200426](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21200426/)
85. Bahia MT, Nascimento AF, Mazzeti AL, Marques LF, Goncalves KR, et al. (2014) Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 4362–4370. doi: [10.1128/AAC.02754-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02754-13) PMID: [24841257](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24841257/)
86. Jones DC, Foth BJ, Urbaniak MD, Patterson S, Ong HB, et al. (2015) Genomic and Proteomic Studies on the Mode of Action of Oxaboroles against the African Trypanosome. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0004299. doi: [10.1371/journal.pntd.0004299](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004299) PMID: [26684831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26684831/)
87. Yu X, Cojocar V, Mustafa G, Salo-Ahen OM, Lepesheva GI, et al. (2015) Dynamics of CYP51: implications for function and inhibitor design. *J Mol Recognit* 28: 59–73. doi: [10.1002/jmr.2412](https://doi.org/10.1002/jmr.2412) PMID: [25601796](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25601796/)

Supplemental Information

Genotype characterization of *T.b. gambiense* Feo strain

Microsatellite analysis of the MORF2-CA, M6C8-CA, MT3033-AC/TC and MEST19-AT/GT loci and minisatellite analysis of the PARP locus (PE procyclin repetition) (1) were performed as previously described (2, 3). Briefly, after PCR, the amplified products were first analyzed on a 1.5 agarose gel and were shipped to Eurofins Genomics (Ebersberg, Germany) for fragment analysis using standard procedures of capillary electrophoresis. The number of repeats at each locus was calculated based on the size of the PCR product (2). We could identify with markers genotype: MEST19, 21/34; PE procyclin A, 20, 21, 22, 29, 30; MT3033,17/17; MORF2, 57/ 57; M6C8, 69/70 that the *T. b. gambiense* Feo strain belongs to group 2 *gambiense* as reported in the table S1.

Table S1: Genotype characterization of the *T. b. gambiense* Feo strain.

Identification	Focus	Year	Host	Isolate Ref.	Genotyping Ref.	Microsatellites (Repetition number)				
						MORF2-CA Allele 1-2	M6C8-CA Allele 1-2	MT3033-AC/TC Allele 1-2	MST19-TA/CA Allele 1-2	PE procyclin Allele 1-2-3-4-5
<i>Trypanosoma bruceigambiense</i> Type I										
1972	Ivory Coast	1997	Human	[2]	[2], This study	16 - 16	13 - 53	30 - 48	22 - 22	15 - 20 - 21 - 24
1135	Ivory Coast	1991	Human	[3]	[3]	16 - 16	13 - 44	30 - 44	22 - 22	15 - 20 - 21
LiTat-1/1	Ivory Coast	1952	Human	[4]	[2]	16 - 16	13 - 44	30 - 43	22 - 22	15 - 19 - 20 - 21
1122	Ivory Coast	1991	Human	[3]	[3]	16 - 16	13 - 44	30 - 44	22 - 22	15 - 20 - 21
TB26	Congo	1983	Pig	[5-7]	[2]	16 - 16	13 - 37	30 - 30	22 - 22	N/D
<i>Trypanosomabruceigambiense</i> Type II										
Feo	Togo	1961	Human	[5,8]	This study	57 - 57	69 - 70	17 - 17	21 - 34	20 - 21 - 25
HTAG/107-1	Ivory Coast	1986	Human	[9-11]	[2]	13 - 48	23 - 37	14 - 14	24 - 25	21 - 22 - 23 - 26 - 28
TH2 (78E)	Ivory Coast	1978	Human	[10,12]	[2]	13 - 49	38 - 48	19 - 22	31 - 40	22 - 23 - 26 - 28
2178	Ivory Coast	1997	Pig	[2]	[2], This study	12 - 43	31 - 35	14 - 28	24 - 31	20 - 21 - 22 - 29 - 30
2171	Ivory Coast	1997	Pig	[2]	[2]	48 - 49	29 - 46	15 - 15	25 - 25	N/D

The genotype of Feo strain was analyzed as described (2) by determining the number of repeats per allele and compared to group 1 and group 2 genotypes. Isolate 1972 and 2178 have been used as controls for group 1 and 2 respectively. N/D: not determined.

Supplemental References

1. Clayton CE, Fueri JP, Itzhaki JE, Bellofatto V, Sherman DR, et al. (1990) Transcription of the procyclic acidic repetitive protein genes of *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol* 10: 3036-3047.
2. Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T (2000) Characterization of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellite markers. *Mol Biochem Parasitol* 105: 187-202.
3. Giroud, C., Ottones, F., Coustou, V., Dacheux, D., Biteau, N., Miezian, B., Van Reet, N., Carrington, M., Doua, F., and Baltz, T. (2009). Murine models for *Trypanosoma brucei* gambiense disease progression from silent to chronic infections and early brain tropism. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e509.
4. Baltz T, Baltz D, Giroud C, Crockett J. Cultivation in a semi-defined medium of animal infective forms of *Trypanosoma brucei*, *T. equiperdum*, *T. eTansi*, *T. rhodesiense* and *T. gambiense*. *Embo J* 1985;4:1273-7.
5. Tait A, Babiker EA, Le Ray D. Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. I. Evidence for the subspeciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology* 1984;89:311-26.
6. Kanmogne GD, Stevens JR, Asonganyi T, Gibson WC. Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res* 1996;82:535-41.
7. Truc P, Tibayrenc M. Population genetics of *Trypanosoma brucei* in central Africa: taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology* 1993;106:137-49.
8. Paindavoine P, Pays E, Laurent M, Geltmeyer Y, Le Ray D, Mehlitz D, Steinert M: The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. *Parasitology*. 1986, 92: 31-50.
9. Stevens JR, Lanham SM, Allingham R, Gashumba JK. A simplified method for identifying subspecies and strain groups in Trypanozoon by isoenzymes. *Ann Trop Med Parasitol* 1992;86:9-28.
10. Bromidge T, Gibson W, Hudson K, Dukes P. Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop (Basel)* 1993;53:107-19.
11. Penchenier L, Mathleu-Daude F, Brengues C, Banuls AL, Tibayrenc M. Population structure of *Trypanosoma brucei* S. L. in Cote d'Ivoire assayed by multilocus enzyme electrophoresis: epidemiological and taxonomical considerations. *J Parasitol* 1997;83:19-22.
12. Mehlitz D, Zillmann U, Scott CM, Godfrey DG. Epidemiological studies on the animal reservoir of Gambiense sleeping sickness. Part III. Characterization of Trypanozoon stocks by isoenzymes and sensitivity to human serum. *Tropenmed Parasitol* 1982;33:113-8.

Article 2

***Trypanosoma brucei gambiense* Secretome Impairs Lipopolysaccharide-Induced
Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells**

Frédéric-Antoine Dauchy^{1,2,3*}, Cécile Bordes^{4,5}, Silla Semballa^{1,2}, Mélanie Bonhivers^{6,7},
Derrick R. Robinson^{6,7}, Jérôme Rambert⁸, Pierrette Courtois^{1,2}, Sylvie Daulouède^{1,2}, Jean-
Loup Lemesre², Philippe Vincendeau^{1,2,9}

¹ University of Bordeaux, UMR IRD CIRAD INTERTRYP 177, laboratoire de parasitologie, F-33000 Bordeaux, France.

² IRD-CIRAD-University of Bordeaux, UMR INTERTRYP 177, F-34394 Montpellier, France.

³ University Hospital of Bordeaux, Department of infectious and tropical diseases, Hôpital Pellegrin, F-33076 Bordeaux, France.

⁴ University Hospital of Bordeaux, laboratoire d'Immunologie et d'Immunogénétique F-33076 Bordeaux, France.

⁵ University of Bordeaux, UMR 5164 CIRID, F-33000 Bordeaux, France.

⁶ University of Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, F-33000 Bordeaux, France.

⁷ CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, F-33000 Bordeaux, France.

⁸ University of Bordeaux, Aquiderm, INSERM U 1035, F-33000 Bordeaux, France.

⁹ University Hospital of Bordeaux, laboratoire de parasitologie, Hôpital Pellegrin, F-33076 Bordeaux, France.

* Corresponding author: Frédéric-Antoine Dauchy, frederic.dauchy@chu-bordeaux.fr

***Trypanosoma brucei gambiense* Secretome Impairs Lipopolysaccharide-Induced Maturation of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells**

Abstract

Trypanosoma brucei gambiense, an extracellular eukaryotic flagellate parasite, is the main etiological agent of Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness. Treatment of this disease is difficult and has serious side-effects. Trypanosomes triggers into their hosts a series of events impairing primarily innate immunity and secondarily specific immunity. As the first step of recognition of a pathogen involves antigen presenting cells, in particular dendritic cells (DCs), we investigated the effects of *T. b. gambiense* and its secretome (excreted/secreted proteins) on human monocyte-derived DCs (Mo-DCs). Mo-DCs were cultured with trypanosomes, lipopolysaccharide (LPS), secretome, or both secretome and LPS. Secretome of *T. brucei gambiense* bloodstream strain Biyamina (MHOM/SD/82) was used for the experiments. The upregulation of HLA-DR and CD83 molecules, as well as the secretion of cytokines such as interleukin-12, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10 were significantly reduced when LPS-stimulated Mo-DCs were cultured in the presence of secretome. Our preliminary results raise the hypothesis that the trypanosome may have developed a strategy of communication toward human DCs through paracrine mediators to induce immune dysregulation. The identification of the *T. b. gambiense* secretome components and of the DCs signaling pathway(s) involved might uncover new therapeutic targets that may be useful in trypanosomiasis.

Introduction

Trypanosoma brucei gambiense, an extracellular eukaryotic flagellate parasite, is the main etiological agent of Human African Trypanosomiasis (HAT), or sleeping sickness. Trypanosomes trigger into their hosts a series of events impairing primarily innate immunity and secondarily specific immunity (1). Treatment of this disease is difficult and has serious side-effects (2). Additionally, no prospect of a vaccine is currently in view. Novel therapeutic targets for treating this infection are thus urgently needed. This requires a better understanding of the different factors involving host characteristics and the intrinsic properties of the parasite, such as its ability to escape the host immune system (3).

The primary immune cells involved in *T. brucei* infection are dendritic cells (DCs) and macrophages, which are capable of producing factors that limit the early outgrowth of parasites (4, 5). DCs are specialized in antigen capture, processing, and presentation to naïve T cells after migration to the draining lymph nodes (6). DC maturation is associated with increased expression of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) that enhance the proliferation of naive T cells, while DC activation is related to the production of inflammatory cytokines that regulate T-cell differentiation (7). In trypanosomiasis, DCs play a fundamental role in the adaptive immune response due to their ability to sense a wide array of variant surface glycoprotein (VSG), leading to induction of IL-12 production and to the promotion of T helper cell polarization (8). Nevertheless, tumor necrosis factor alpha (TNF- α)- and nitric oxide synthase 2-producing DCs are involved in trypanosome infection-associated pathogenesis (9). Furthermore, an impaired allostimulatory capacity of murine DCs has been described, leading to a Th-cell response that does not exert anti-trypanosome activity (8, 10). A class of proteins that is particularly noteworthy with respect to immunomodulation is the parasite secretome (excreted-secreted proteins), among which several proteins were analyzed individually and were shown to be involved in various aspects of the virulence process or pathogenesis (11-14). To date, most of the data concerning the role of DCs and of secretome during trypanosomiasis are limited to murine models. As the first step of recognition of trypanosomes involves DCs, we investigated the effects of *T. b. gambiense* and its secretome on the phenotype of human monocytes-derived DCs (Mo-DCs).

Material and Methods

Trypanosome and secretome.

Trypanosome bloodstream strain Biyamina (MHOM/SD/82) was used for the experiments (13-14). The parasites were intraperitoneally injected into mice. When their multiplication reached the logarithmic growth stage, the parasites were purified from blood by chromatography on a DEAE-cellulose column, as previously described (15) and washed in RPMI medium. To obtain secretome, the parasites were resuspended at a concentration of 200×10^6 cells/mL in a secretion buffer (Ringer lactate; glucose 0.6%; KCl 0.4%; NaHCO_3 0.125%; l-glutamine 2 mM; minimal essential medium nonessential amino acids, pH 8) (12) and incubated at 37°C in 5% CO_2 for 2 hours. Every 15 min, parasite viability was checked by microscopic examination. Parasite viability was always high (> 98%) and remained constant for 2 hours. At the end of the experiment, the reaction was stopped by centrifugation of parasites at $1,200 \times g$ for 10 min. The supernatant was collected and filtered on a 0.22 μm filter and immediately aliquoted and frozen at -80°C until use. The protein concentration was determined by the Bradford dye binding procedure (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

Generation of Mo-DCs.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from buffy coats (*Etablissement Français du Sang*, France) via Ficoll density gradient centrifugation (Eurobio, France). Monocytes were separated by positive selection of CD14^+ cells using antibody-conjugated magnetic beads (Miltenyi Biotec, France) according to the manufacturer's recommendations. After isolation, cells were washed once in fresh complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS), 100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, 25 mM HEPES and 2 mM sodium pyruvate. Freshly isolated monocytes expressed high levels of CD14, and the purity of the cells as determined by flow cytometry was >95%. Immature monocyte-derived DCs were generated by culturing 2.10^6 monocytes/well in complete RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 50 ng/mL granulocyte-macrophage colony-stimulating factor ([GM-CSF] R&D Systems, UK) and 20 ng/mL recombinant interleukin 4 ([IL-4] R&D Systems, UK) (16, 17). A total of 2.10^6 cells per well were cultivated in six-well culture plates. Fresh medium containing IL-4 and GM-CSF was added every two day to the cell cultures. On day 6, cells were harvested and washed once in fresh complete RPMI 1640 medium.

Cultures and flow cytometry.

Immature DCs were collected and cultured for 48 hours at 37°C with either directly the

living parasite *T. b. gambiense* (2.10^6 parasites/well), its secretome (50 µg/mL), lipopolysaccharide (LPS) (100 ng/mL), both secretome and LPS, or medium supplemented with secretion buffer as a control. The culture supernatants were collected and stored at -80°C for cytokine analysis. DCs surface markers expressions were analyzed using a flow cytometer (FACS Canto II, BD Biosciences). Cells were collected in phosphate-buffered saline (PBS) containing 2% bovine serum albumin (BSA) and stained (45 min at 4°C) with fluorescein isothiocyanate (FITC)-, allophycocyanin (APC)- or phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal antibodies (MAbs) to CD14, CD11b, HLA-DR (Human Leukocyte Antigen - antigen D Related), CD83, CD80, CD86, CD40, DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin or CD209), CD206 (macrophage mannose receptor), PD-L1 (programmed cell death ligand-1 or CD274), OX40-L (OX40-ligand or CD252) and ICOS-L (CD28-like receptor inducible costimulatory-ligand or CD275) (BD Biosciences, France) or the appropriate isotype controls. After two rounds of washing in PBS-BSA, cells were fixed in 1% formaldehyde-PBS and 5 000 cells were recorded per sample. Non-viable cells were excluded using propidium iodide dye (BD Biosciences, France). Data were analyzed using FACSDiva (BD Biosciences) software. Median fluorescence intensities (MFIs) were determined after subtraction of the values for the isotype controls. The percentages of positively expressing cells were also determined.

Detection of cytokines.

Cytokine levels in the cell culture supernatants were measured (TNF- α , IL-1 β , IL-1RA, IL-10, IL-12p70 and active TGF- β) using a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's instructions (DuoSet, R&D Systems, UK). Briefly, a 96-wells microplate (immuno-plate maxisorp, Nunc, Denmark) was coated with capture antibody over-night at room temperature. Samples or standards were added to the plate and incubated for 2 hours at room temperature. Free sites were blocked with PBS containing 1% BSA. Biotinylated polyclonal detection antibody was added for 2 hours at room temperature. At the end of the incubation period, streptavidine conjugated to horseradish peroxidase was added to the wells. After additional 20 min incubation, hydrogen peroxide (H₂O₂) and tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution (1:1) were added. After 20 min, the reaction was stopped by 2M H₂SO₄ solution. Each plasma sample was analyzed in duplicates. The absorbance of each well was measured at 450 nm using a microplate reader (Spectrostar nano, BMG labtech, Germany).

Statistics.

Results are expressed as the mean plus or minus standard error to the mean (sem). Statistical analyses were performed using a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test. *P* values of <0.05 were considered significant.

Results

Most, if not all, analyses of dysregulated innate host immune system during trypanosomal infections were made on murine models. To analyse the potential immunomodulatory activity of *T. brucei gambiense* in human settings, we assess the effect of *T. gambiense* secretome on DC maturation and activation *in vitro*, using human monocyte-derived DC. To that end, trypanosomes, LPS, secretome or both were added to human Mo-DCs in culture.

The *T. b. gambiense* secretome reduces LPS-induced CD83 and HLA-DR expression in human Mo-DCs.

The phenotype of DCs was routinely determined by flow cytometry. Immature DCs expressed high levels of HLA-DR and CD11b, whereas CD14 was downregulated. To analyze the potential immunomodulatory activity of *T. b. gambiense* toward human DCs, trypanosomes, LPS, secretome, or both secretome and LPS were added to 6 day-cultured Mo-DCs. After incubation, DCs were collected and observed after centrifugation by immunofluorescence microscopy. Figure 1 shows representative flow cytometric histograms for one of twelve independent experiments. Compared to controls, LPS increased significantly the expression of HLA-DR, of CD83 (a marker of DCs maturation) and of costimulatory molecules CD80, CD86, CD40 and PD-L1, while expressions of DC-SIGN and of CD206 were downregulated. DCs cultures with trypanosomes or with secretome did not induced any changes in markers expression. Only CD83 expression was slightly but not significantly increased compared to controls when cultured with trypanosomes.

We then evaluated whether *T. gambiense* secretome could modify LPS-induced phenotypic changes in Mo-DCs. A significant inhibition of the LPS-induced CD83 and HLA-DR expressions were observed in the presence of secretome ($p=0.03$ and $p=0.01$, respectively) (Figure 2). Noteworthy, levels of expression of CD40, CD80, CD86, PD-L1, OX40-L, ICOS-L, CD206 and DC-SIGN were unchanged. Thus, we observed that *T. gambiense* secretome modulated Mo-DCs maturation.

The *T. b. gambiense* secretome impairs cytokines production by human Mo-DCs.

To investigate the effect of the secretome on the ability of DCs to polarize T cells response, the cytokine profile of LPS-stimulated DCs was determined. At first, the secretomes of *T. b. gambiense* alone had no effect on DC cytokine production. Interestingly, LPS-induced cytokine production by Mo-DCs was significantly inhibited in the presence of secretome, as indicated by a significant decrease in the production of IL-12 (-35.9%; $p=0.03$), TNF- α (-24.7%; $p=0.01$) and IL-10 (-44.2%; $p=0.01$) (Figure 3). In line with the decreases in CD83

maturation expression, *T. gambiense* secretome down regulated cytokines production by LPS-activated Mo-DCs.

Discussion

We studied the effects of *T. gambiense* secretome on human DCs. We observed that the expression of HLA-DR and CD83 were reduced by secretome in LPS-stimulated human Mo-DCs, which corresponds to an impairment of DCs maturation. We also showed that this effect was associated with a reduced production of cytokines by the DCs.

Antigen-presenting cells (macrophages and DCs) play a central role in the immune response in trypanosomiasis (4, 5, 18-21). To date, most analyses of dysregulated innate host immune system during trypanosomal infections were made on murine models. According to Dagenais *et al.*, during early stage of murine infection with *T. b. rhodesiense* clone LouTat 1, DCs are more potent than macrophages at activating naive VSG-specific Th cells, resulting in protective Th1 responses (22). Modulation of function of DCs is an obvious way of the parasite to escape killing by immune cells and may contribute to global immunosuppression occurring during trypanosomiasis. Indeed, Dagenais *et al.* suggest that the initial uptake of parasite antigens interferes with DCs antigen presentation and may have dramatic consequences for subsequent T-cell responses to trypanosomes or even unrelated pathogens (22). Pletinckx *et al.* observed that VSG induces partial maturation of murine DCs, leading to a default Th2-cell response that does not have anti-trypanosome activity (8). For our part, we investigated the effect of the parasite secretome and found a significant maturation impairment of human DCs. The hallmarks of this effect were an inhibition of the LPS-induced CD83 and HLA-DR expression, whereas costimulatory molecules (CD80, CD86, CD40 and PD-L1) and C-type lectin receptors (DC-SIGN and CD206) were correctly expressed. This contrast with a previous study from Garzon *et al.* which found that trypanosome secretome exerts suppressive activity on LPS-stimulated murine DCs by inhibiting both the expression of CD80, CD86, CD40 and MHC class II molecules (4). These differences could be partly explained by the influence of the specificity of the immune response according to different hosts (21). However, the resulting cytokine profiles were similar to our study, with inhibition of cytokines such as TNF- α , as well as IL-10 (4). These cytokines are key mediators of Th1 and Th2 responses (23). Our work should be continued in order to evaluate the allostimulatory capacity of human DCs exposed to secretome and Th1/Th2/Th17 cytokines production by co-cultured lymphocytes.

Similar changes in surface markers and cytokine profiles have been reported for others *Trypanosomatidae*, such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. Secretion of the cytokines IL-12, TNF- α , and IL-6 as well as the upregulation of HLA-DR and CD40 molecules were significantly reduced after *T. cruzi* infection. The same effects could be induced by *T. cruzi*-

conditioned medium, indicating that at least these inhibitory effects were mediated by soluble factors released by *T. cruzi* (24). Comparable results were found in *Leishmania*-infected murine DCs, which showed decreased CD40, CD86, and MHC-II expression and loss of their capacity to induce T-cell proliferation (25). These observations point to the importance of *Trypanosomatidae* secreted proteins at the time of infection to quickly switch off the pro-inflammatory process and establish infection.

Our preliminary results raise the hypothesis that the trypanosome may have developed a strategy of communication toward DCs through paracrine mediators to induce immune dysregulation, including in human settings. The identification of the factor(s) in the *T. b. gambiense* secretome and of the DCs signaling pathway(s) involved might uncover new therapeutic targets that may be useful in HAT.

Acknowledgments

We thank Professor Michel Dupon (University of Bordeaux) for his help during the study. We are grateful to Vincent Pitard for his help with flow cytometry experiments (*plateforme de cytométrie TransBioMed*, University of Bordeaux). We are grateful to Katia Boniface and Julien Seneschal for technical support. We thank Patricia Nabos for technical assistance. This research was supported by internal funding and support from the *Association pour le développement de la recherche en parasitologie et médecine tropicale*.

Conflict of interest: None

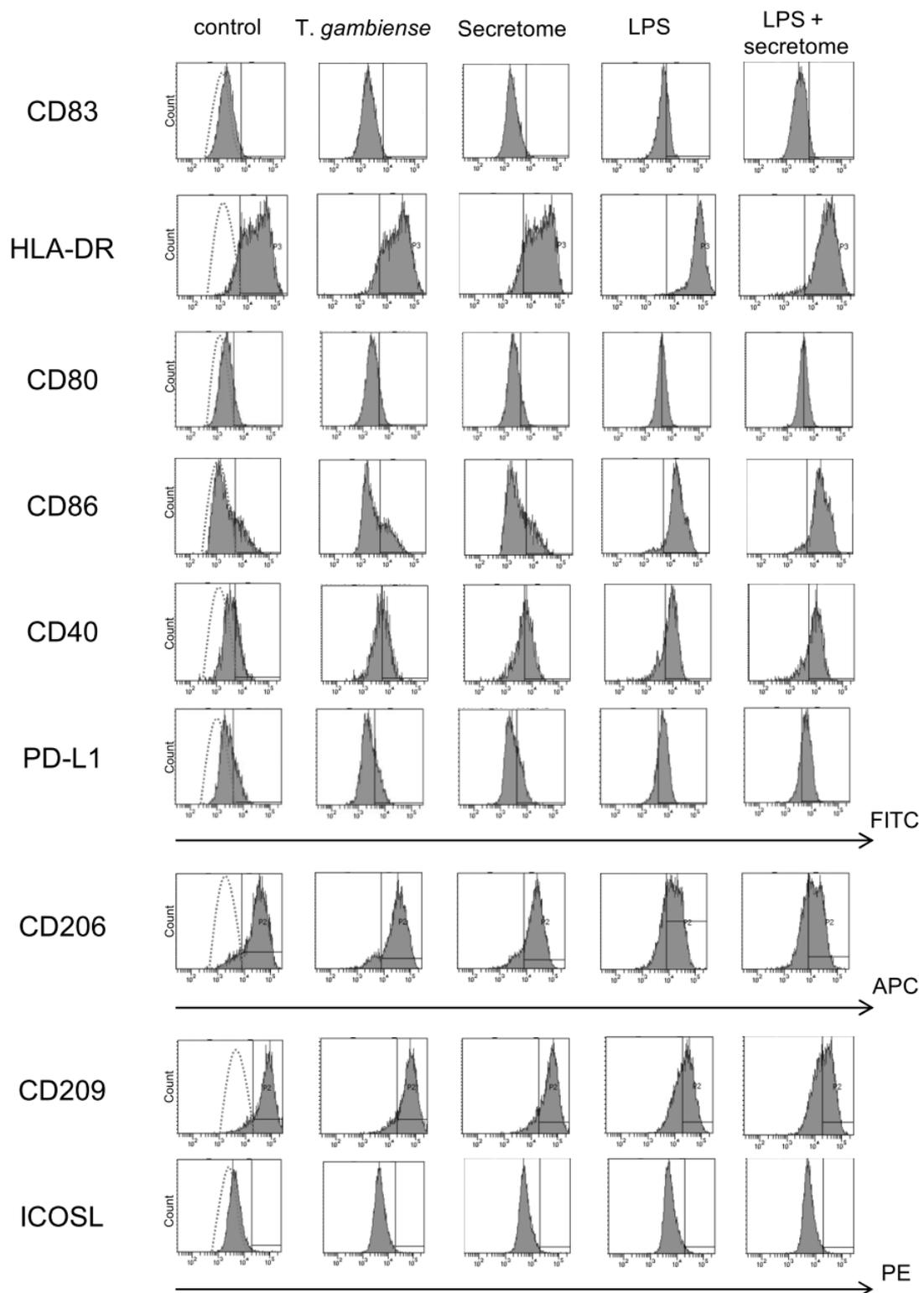


Figure 1: Flow cytometric analysis of DCs. Panel shows representative histograms for one of twelve independent experiments. Human Mo-DCs were cultured with trypanosomes, LPS, secretome, or both secretome and LPS for 48 hrs. Medium supplemented with secretion buffer was used as a control. Dotted histograms represent isotype controls.

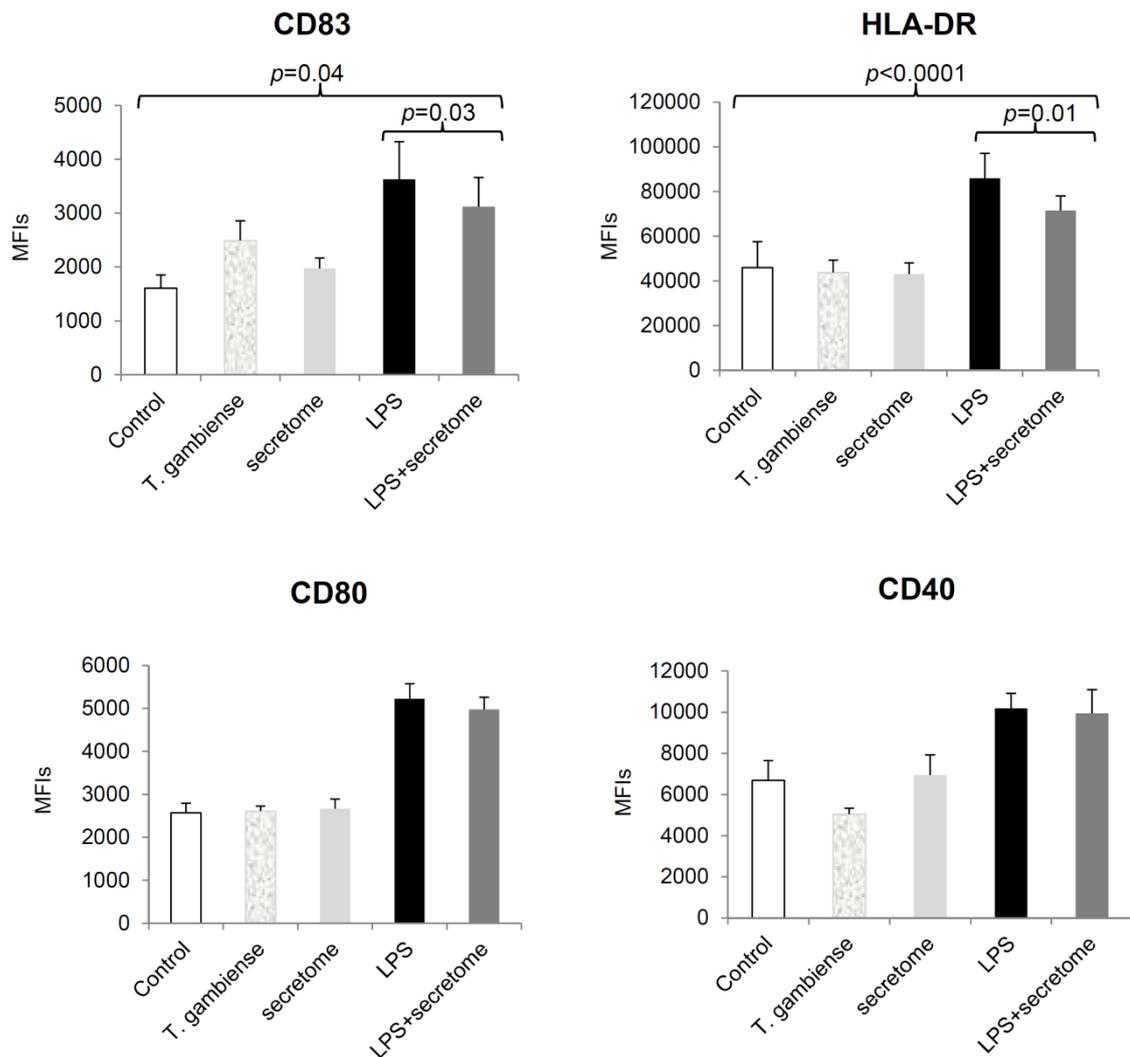


Figure 2: The *T. b. gambiense* secretome reduces CD83 and HLA-DR expression in LPS-stimulated human Mo-DCs. Mo-DCs were cultured with trypanosomes, LPS, secretome, or both secretome and LPS for 48 hrs. Medium supplemented with secretion buffer was used as a control. Numbers correspond to mean fluorescence intensity (MFIs) obtained with each DCs marker (n=5 000 cells). Error bars represent the standard error to the mean (sem) from the 12 independent experiments.

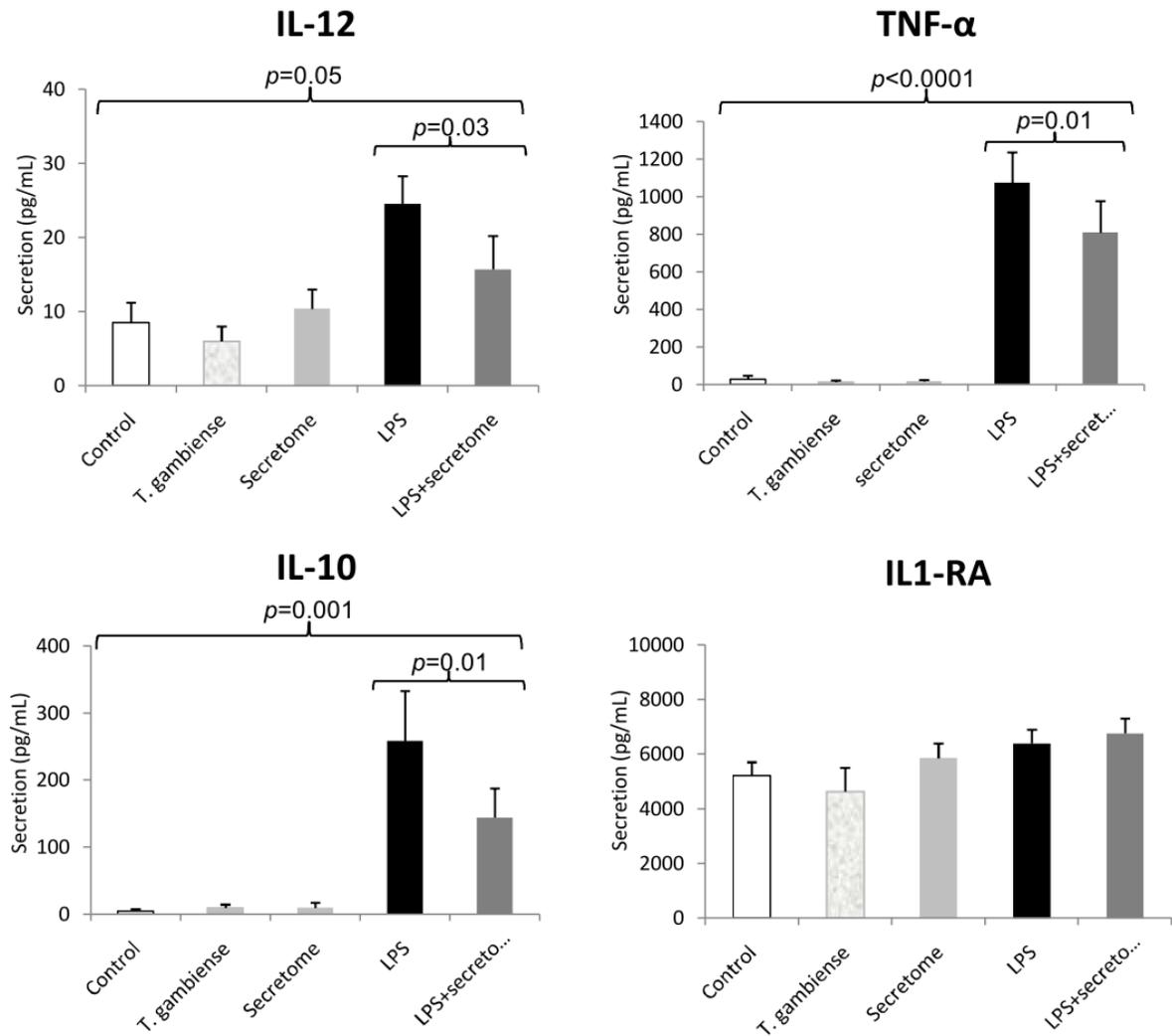


Figure 3: The *T. b. gambiense* secretome impairs inflammatory cytokines production by human Mo-DCs. Mo-DCs were cultured with trypanosomes, LPS, secretome, or both secretome and LPS. Medium supplemented with secretion buffer was used as a control. TNF- α , IL-1RA, IL-10 and IL-12p70 production by DCs were detected by ELISA after 48 h of incubation. Error bars represent the standard error to the mean (sem) from the 12 independent experiments.

References

- 1- Stijlemans B, Caljon G, Van Den Abbeele J, Van Ginderachter JA, Magez S, De Trez C. Immune evasion strategies of *Trypanosoma brucei* within the mammalian host: progression to pathogenicity. *Front Immunol.* 2016 7: 233.
- 2- Malvy D, Chappuis F. Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect.* 2011 17: 986-995.
- 3- Dos-Santos AL, Carvalho-Kelly LF, Dick CF, Meyer-Fernandes JR. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. *Exp Parasitol.* 2016 167: 67-75.
- 4- Garzon E, Holzmuller P, Bras-Gonçalves R, et al. The *Trypanosoma brucei gambiense* secretome impairs lipopolysaccharide-induced maturation, cytokine production, and allostimulatory capacity of dendritic cells. *Infect. Immun.* 2013 81, 3300e3308.
- 5- Harris T.H, Mansfield J.M, Paulnock, D.M, CpG oligodeoxynucleotide treatment enhances innate resistance and acquired immunity to African trypanosomes. *Infect. Immun.* 2007 75, 2366e2373.
- 6- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 392: 245-252.
- 7- Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends Immunol.* 2016; Sep 7: doi: 10.1016.
- 8- Pletinckx, K., Stijlemans, B., Pavlovic, V., et al. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or *Trypanosoma brucei* antigens instruct default Th2-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 2011 41: 3479e3494.
- 9- Bosschaerts T, Guilliams M, Stijlemans B, Morias Y, Engel D, Tacke F, Hérin M, De Baetselier P, Beschin A. Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS Pathog.* 2010 6: e1001045.10.1371
- 10- Dagenais TR, Freeman BE, Demick KP, Paulnock DM, Mansfield JM. Processing and presentation of variant surface glycoprotein molecules to T cells in African trypanosomiasis. *J. Immunol.* 2009 183: 3344-3355.
- 11- Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ. Trypanosome hydrolase and the blood-brain barrier. *Trends Parasitol.* 2002 18: 17-19.
- 12- Holzmuller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Goncalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* 2008 10: 79-86
- 13- Geiger A, Hirtz C, Bécue T, Bellard E, Centeno C, Gargani D, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology.* 2010 10: 20.
- 14- Atyame Nten CM, Sommerer N, Rofidal V, Hirtz C, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB, Geiger A. Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains. *J Biomed Biotechnol.* 2010 2010: 212817. doi: 10.1155/2010/212817.
- 15- Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp. Parasitol.* 1970 28: 521-534.
- 16- Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994 179: 1109-18.

- 17- Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeier D, Friedrichs D, Gieseler RK. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 1993 329: 275-80.
- 18- Namangala B, Brys L, Magez S, et al. *Trypanosoma brucei brucei* infection impairs MHC Class II antigen presentation capacity of macrophages. *Parasite Immunol* 2000 22: 361-370.
- 19- Namangala B. How the African trypanosomes evade host immune killing. *Parasite Immunol* 2011 33: 430-7.
- 20- Shi MQ, Wei GJ, Tabel H. *Trypanosoma congolense* infections: MHC class II-restricted immune responses mediate either protection or disease, depending on IL-10 function. *Parasite Immunol.* 2007 29: 107-11.
- 21- Holzmüller P, Nirdé P, Vezilier F, Chuchana P. The transcriptomic analytical level determines the human monocyte-derived macrophage response toward either the infectious agent or the host. *Infect Genet Evol.* 2016 45: 426-433.
- 22- Dagenais TR, Freeman BE, Demick KP, et al. Processing and presentation of variant surface glycoprotein molecules to T cells in African trypanosomiasis. *J Immunol* 2009 183: 3344-3355.
- 23- Kobayashi T, Walsh PT, Walsh MC, Speirs KM, Chiffoleau E, King CG, Hancock WW, Caamano JH, Hunter CA, Scott P, Turka LA, Choi Y. TRAF6 is a critical factor for dendritic cell maturation and development. *Immunity* 2003 19: 353-363.
- 24- Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect. Immun.* 1999 67: 4033-4040.
- 25- Figueiredo AB, Serafim TD, Marques-da-Silva EA, Meyer-Fernandes JR, Afonso LC. *Leishmania amazonensis* impairs DC function by inhibiting CD40 expression via A2B adenosine receptor activation. *Eur. J. Immunol.* 2012 42: 1203-1215.

Article 3

***Trypanosoma musculi* infection in mice critically relies on mannose receptor-mediated arginase induction by a *TbKHC1* kinesin heavy chain homolog**

Romaric Nzoumbou-Boko^{1,2}, Géraldine De Muylder³, Silla Semballa^{1,2}, Laurence Lecordier³, Frédéric-Antoine Dauchy^{1,4}, Alain P. Gobert^{5,6}, Philippe Holzmüller^{1,7}, Jean-Loup Lemesre⁸, Rachel Bras-Gonçalves⁸, Sylvie Daulouède^{1,2}, Pierrette Courtois^{1,2}, Pierrick Uzureau³, Alain Beschin^{3,9,10}, Etienne Pays³, Philippe Vincendeau^{1,2,*}

¹ University of Bordeaux, UMR InterTryp 177 IRD/CIRAD, Laboratoire de Parasitologie, F-33000 Bordeaux, France.

² University Hospital of Bordeaux, Department of Parasitology, Hôpital Pellegrin, F-33076 Bordeaux, France.

³ Laboratory of Molecular Parasitology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

⁴ University Hospital of Bordeaux, Department of Infectious and Tropical Diseases, Hôpital Pellegrin, F-33076 Bordeaux, France.

⁵ Division of Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition, Department of Medicine, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232, USA

⁶ Center for Mucosal Inflammation and Cancer, Vanderbilt University Medical Center, Nashville, TN 37232, USA

⁷ CIRAD, UMR CIRAD-INRA Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes CMAEE, TA A-15/G, Campus International de Baillarguet, F-34398 Montpellier, France

⁸ Institut de Recherche pour le Développement, UMR177 IRD/CIRAD "INTERTRYP", Montpellier, France

⁹ Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, VUB, B-1050, Brussels, Belgium

¹⁰ Laboratory of Myeloid Cell Immunology, VIB Inflammation Research Center, Ghent, Belgium

*Corresponding author: Philippe Vincendeau, philippe.vincendeau@u-bordeaux.fr

***Trypanosoma musculi* infection in mice critically relies on mannose receptor-mediated arginase induction by a *TbKHC1* kinesin heavy chain homolog**

Abstract

Arginase activity induction in macrophages is an escape mechanism developed by parasites to cope with the host's immune defense and benefit from increased host-derived growth factor production. We report that arginase expression and activity were induced in macrophages during mouse infection by *Trypanosoma musculi*, a natural parasite of this host. This induction was reproduced *in vitro* by excreted/secreted factors (ESF) of the parasite. A monoclonal antibody directed to *TbKHC1*, an orphan kinesin heavy chain from *Trypanosoma brucei*, inhibited *T. musculi* ESF-mediated arginase induction. Anti-*TbKHC1* antibody also inhibited *T. musculi* growth, both *in vitro* and *in vivo*. Induction of arginase activity and parasite growth involved C-type lectin receptors, as mannose injection decreased both arginase activity induction and parasite load *in vitro* and *in vivo*. Accordingly, the parasite load was reduced in mice lacking the mannose receptor C-type 1 (Mrc1). The *T. musculi* KHC1 homolog showed high similarity with *TbKHC1*. Bioinformatics analysis revealed the presence of homologs of this gene in others trypanosomes, including pathogens for humans and animals. Host metabolism dysregulation represents an effective parasite mechanism to hamper host immune response and modify host molecule production to favor parasite invasion and growth. Thus, this orphan kinesin plays an important role in promoting trypanosome infection and its neutralization or the lock of its partner host molecules offers promising approaches to increasing resistance to infection and new developments in vaccination against trypanosomiasis.

Introduction

Parasites have developed various strategies to escape the immune response and take advantage of host growth factor production. So, parasites need to reduce production of toxic molecules, including nitric oxide (NO) and its derivatives, synthesized by the immune system, in particular by macrophages (1-3).

Macrophages are activated and programmed into different functional subtypes in response to signals delivered by the microenvironment. Distinct macrophage activation states have been widely acknowledged, with the classical activation (M1) and the alternative activation (M2) as extremes (8). M1 macrophages produce effector molecules (reactive oxygen species, NO) and inflammatory molecules (TNF- α , IL-1 α , IL-6). The various forms of M2 macrophages generally have high levels of mannose receptor and arginase 1 upregulation (8). In trypanosomiasis, macrophages are characterized by the induction of arginase (4-6). Arginase hydrolyzes L-arginine to L-ornithine and urea, decreasing the intracellular pool of L-arginine, thus also reducing trypanotoxic NO production by NO synthase 2 (NOS2). Moreover, L-ornithine is a precursor for the synthesis of polyamines and trypanothione, essential for trypanosomatid survival (7). Thus, increased arginase activity is likely to counteract the host immune response and favor parasite growth.

In human African trypanosomiasis caused by *T. gambiense*, arginase serum levels increase and return to control values after treatment (9). Accordingly, in experimental murine infection by *T. brucei*, host macrophage arginase activity represents a marker of susceptibility to the disease (10). In *T. brucei*, arginase activity is induced by excreted/secreted factors (ESF); in particular, *TbKHC1*, a kinesin heavy chain has been identified as the arginase inducing factor (11). Arginase induction in macrophages was shown to promote infection by providing polyamine nutrients for trypanosomes, which cannot generate their own source of L-ornithine through the activity of a functional arginase enzyme (11, 12).

We investigated the role of arginase activity induction during murine trypanosomiasis caused by its natural parasite, *Trypanosoma muscili*. In this natural infection model, blood parasitemia lasts 20-25 days, comprising a growth phase, a plateau and an elimination phase. Although the control of the dynamics of *T. muscili* infections is in part nonimmunological (13-16), elimination of this parasite requires antibodies and macrophages. Yet, the immune mechanisms controlling early *T. muscili* proliferation are poorly characterized.

Materials and Methods

Mice

Female Swiss mice aged 6 to 8 weeks were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). SIGN-R1 KO and congenic control (BALB/c background), B6, and Mrc1 KO B6 mice (C57BL/6 background) were bred in the Laboratory of Molecular Parasitology of Université Libre de Bruxelles.

Experiments, maintenance, and care of mice complied with the guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (CETS n°123). Experiments were approved by the Department for the protection of animals and plants of the Préfecture de la Gironde (Identification number A33-063-324) and the Ethical Committee for Animal Experiments at the Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium (laboratory accreditation number LA2500482).

Reagents

D (+) mannose, D (+) galactose, S-(2-boronoethyl)-L-cysteine (BEC), L-arginine, L-ornithine, protease inhibitor cocktail, α -isonitrosopropiophenone, DEAE cellulose, Triton X-100, urea, Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), propidium iodide, and MnCl₂ were obtained from Sigma-Aldrich Chemie (Saint-Quentin Fallavier, France). TRIzol reagent was obtained from Invitrogen (Illkirch, France); FITC anti-mouse CD206 (Mrc1) from Biolegend (San Diego, CA); APC-rat anti-mouse CD14 from BD Biosciences (Le Pont de Claix, France); and PE-anti-mouse CD209 (SIGN-R1) monoclonal antibody and control antibody from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany). For cell culture and RNA analysis, all the reagents were obtained from Life Technologies (Villebon sur Yvette, France).

Parasites

Trypanosoma musculi (Partinico II strain) was originally obtained from The London School of Hygiene and Tropical Medicine (17). Parasites were stored in liquid nitrogen or maintained *in vivo* by a peritoneal injection (5.10⁴ parasites per mouse) into naive Swiss mice. When required, animals were treated intraperitoneally with 0.2 ml physiological saline, mannose (50 mM), or galactose (50 mM) four times/day, beginning day 1 post-infection. Mice were also given anti-*TbKHC1* Ab (10) or an IgG2b isotype control (250 μ g in 0.5 ml saline) or physiological saline (0.5 ml). Parasitemia was monitored by tail blood puncture from the 5th day to the 24th of infection.

Parasite excreted/secreted factors

Parasites from 10-day-infected mice were purified from blood by chromatography on DEAE

cellulose (18). Soluble parasite ESF were prepared in a protein-free culture medium, according to a method previously described (19). Purified parasites (2.108/ml) were incubated in this medium for 2 hours at 37°C. Parasite viability was initially assessed by microscopic examination and then by flow cytometry after propidium iodide staining. Supernatant containing ESF was separated from trypanosomes by centrifugation (1,000g, 10 min, 4°C) and filtered using a 0.22 µm low-binding protein filter (Millipore, Molsheim, France). Protein concentration was estimated by the Bradford method, using a Bio-Rad kit (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France).

Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and immunoblotting procedures

SDS–PAGE was carried out under non reducing conditions in 10% polyacrylamide gels (20) and subsequently stained with silver. Protein samples were transferred to nitrocellulose membrane (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) and subsequently blocked, as previously described (21, 22). The membrane was incubated with mouse monoclonal antibodies at the 1/100 dilution at 37 °C for 2 h. After three washings, the membranes were immersed in peroxidase-conjugated anti-murine Ig (Dako, Les Ulis, France) diluted at 1:10,000 at room temperature for 2 h. After washing, membranes were exposed to Clarity enhanced chemiluminescence (ECL) reagent (Cat. # 170–5061, Bio-Rad) at room temperature for 2 min and visualized using a ChemiDoc MP (Cat. # 170–8280, Bio-Rad). Band intensities were detected and quantified using Image Lab 5.0 software (Bio-Rad).

Cloning and sequencing KHC genes

The *T. muscili* KHC sequence was amplified from gDNA with primers designed from the alignment of KHC sequences of *T. brucei* (Tb927.6.4390) and *T. theileri* (provided by Dr. Ivens and Prof. Matthews). The resulting fragment, corresponding to nucleotides 275 to 2780 of *T. brucei*, was fully sequenced after subcloning in Zero BluntTOPO vector (Invitrogen). Primers specific for the *T. muscili* sequence were then designed to amplify the 5' and 3' extremities of the *TmKHC* transcript from total RNA by 5' and 3' RACE (RT-PCR First Choice RLM-RACE kit (Ambion, Merelbeke, Belgium). The resulting PCR fragments were cloned into the Zero BluntTOPO vector and sequenced. The following primers were used:

TthKHC F: 5'-AATTTTGATGGTGCCTTTG-3';

TthKHC R: 5'-ATTGACATATAATCATCCATTGCAAT-3';

TmKHC 5'R out: 5'-AAACGCGTGGTCAACGCACG-3';

TmKHC 5'R in: 5'-GCAACACTCTCGAAGATCTGC-3';

TmKHC 3'F out: 5'-GTGAACTTCGGGAAATAATTGCGTCAGC-3';

TmKHC 3'F in: 5'-GTCAGCGCATTTATCTGTTCCGGAATC-3'.

Peritoneal macrophage cultures

Peritoneal macrophages were cultured in 96-well plates (105/well) in RPMI medium supplemented with 2% FBS, 20 mM HEPES, 2 mM sodium pyruvate, 10⁻⁴ M 2-mercaptoethanol, 10 µg/ml gentamicin, and 3% glucose, in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C, as previously described (4). Viability, determined by trypan blue dye exclusion, was greater than 98% and purity, determined by May Grümwald Giemsa and non-specific esterase staining, revealed that over 96% of the cells were macrophages. ESF (10 µg/200 µL), BEC (100 µM), mannose and galactose (up to 50 mM), L-ornithine (2.5 mM), and antibodies (3 µg/200 µL), were added to the culture medium when required.

The macrophage culture medium was removed 48 hours later to obtain a macrophage-conditioned medium (MCM) (23). A medium, set under the same conditions but not exposed to macrophages, was used as the control medium (CM). After collection, these media were centrifuged at 1,000g for 5 min, and stored at -80°C until use. Macrophages from naive mice (105/well) were co-cultured with purified *T. musculi* (400/well) in culture medium (24). Parasites were counted after 3-days in co-culture.

Measuring arginase activity

Arginase activity was measured in macrophages cultured with *T. musculi* or ESF for 48 hours; or in *ex vivo* macrophages from uninfected mice or infected animals at days 7, 10, 15, 20, and 24 post-infection. Arginase activity was measured by a colorimetric method, as previously described (25). Briefly, 10 mM MnCl₂ and 0.5 M L-arginine were added in turn to macrophage lysates and incubated at 37°C for 1 h. The reaction was stopped by adding an acid solution and the urea formed by arginase was revealed by adding α-isonitrosopropiophenone at 100°C for 45 min. The colored product was quantified by absorption at 540 nm.

Semi-quantitative PCR for arginase mRNA

Mouse peritoneal macrophages were plated in 60-mm dishes at a density of 2×10⁶ cells. Total RNA was extracted using TRIzol reagent. Total RNA (2 µg) was retro-transcribed using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's instructions. Amplification of specific PCR products was detected using the FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Basel, Switzerland) and the following primers: *Arg1*, 5'- AAGAAAAGGCCGATTCACCT-3' and 5'-CACCTCCTCTGCTGTCTTCC-3' 201 bp; *Arg2*, 5'-ACAGGGTTGCTGTCAGCTCT-3' and 5'-TGATCCAGACAGCCATTTCA-3', 298 bp. PCR was performed using the ABI Prism 7900HT (ABI, New York, NY, USA). Fold differences in gene expression were calculated as 2^{-ΔΔCt} using β-actin as the housekeeping gene (10).

Flow cytometry

Peritoneal cells from *T. musculi*-infected mice were removed at 13 days post-infection. Peritoneal cells from non-infected mice were used as control. Cells (10⁶/ml) were incubated with APC-anti-mouse CD14 and FITC-anti-mouse CD206 (MR), or PE-anti-mouse CD209 (SIGN-R1), or the corresponding control antibodies. After 20 min, cells were washed and resuspended in PBS containing 0.5% FCS. Cells were analyzed by flow cytometry (BD FACSCanto and FACSDiva software version 6.1.2).

Determination of the taxonomic positions of trypanosome KHC

The protein sequences of *T. musculi*, *T. brucei* and *T. theileri* KHC were compared to homologs in GenBank by using the algorithm “protein BLAST” (Basic Local Alignment Search Tool) from the NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). In order to reconstruct a phylogenetic tree, we selected the sequences from the non-redundant protein sequences database according three criteria: i) identity of more than 50% ii) query cover of more than 50% and iii) the sequence species were previously characterized as *T. brucei*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. congolense*, *T. evansi*, *T. cruzi*, *T. theileri* and *T. grayi* and their subspecies. MEGA6 (26) was used for sequence alignment and tree reconstruction. The best amino acid substitution model was estimated by the BIC criterion (Bayesian Information Criterion) and used to build a maximum likelihood (ML) tree itself tested by the bootstrap method with 100 replications.

Statistical analysis

Quantitative data are expressed as means + SEM. The Student *t* test was used for comparison between two groups. Prism 5.0 (Graph Pad, La Jolla, CA) was used for analyses.

Results

Arginase activity is induced in macrophages of *T. musculi*-infected mice

Arginase activity was measured in macrophages from infected mice at different days post-infection. This activity peaked between days 13-17 and paralleled the number of circulating parasites (Fig. 1A).

Levels of *Arg1* and *Arg2* mRNA expression in peritoneal macrophages were determined by RT-PCR. The level of *Arg1* was ~ 12-fold higher in macrophages from mice 13 days post-infection with *T. musculi* compared to macrophages from uninfected mice, whereas *Arg2* expression was not induced (Fig. 1B).

Arginase activity is induced *in vitro* in macrophages incubated with *T. musculi* ESF

In macrophages co-cultured with *T. musculi*, arginase activity increased compared to controls (Fig. 2). Arginase activity was still induced, even after separation of parasites from macrophages by a 0.22 µm filter support. Finally, arginase activity induction was also observed in macrophages cultured with excreted/secreted factors (ESF) (Fig. 2).

Arginase induction promotes *T. musculi* growth

T. musculi was grown either in the presence of macrophages or in a 2-day parasite free-macrophage culture medium (macrophage conditioned medium, MCM) (23, 24). Adding BEC, an arginase inhibitor, to the parasite-macrophage culture dramatically reduced parasite growth, which was restored by adding L-ornithine (Fig. 3). MCM promoted parasite growth, whereas the control medium (CM) had no effect. Addition of BEC to MCM just prior to incubation with parasites had no effect on parasite growth, indicating that BEC had no direct effect on parasites (Fig. 3).

A *TbKHC1*-like component is present in *T. musculi* ESF and genome

In western blot, a monoclonal antibody directed to *TbKHC1*, a previously described arginase-inducing factor from *T. brucei* (11), recognized a band in *T. musculi* ESF, corresponding to the molecular weight of *TbKHC1* (122 kDa) (Fig. 4).

To identify a putative *T. musculi* KHC gene, we first aligned the *TbKHC1* sequence with the *T. theileri* homolog, which is more closely related to *T. musculi*. Two primers were designed in conserved regions to amplify a 2505 nucleotide fragment from *T. musculi* gDNA. Sequencing of this fragment showed 70% and 63% identity with *TbKHC1* at DNA and protein levels, respectively. This sequence was used to design two sets of primers for the amplification of 5' and 3' ends of the *T. musculi* gene by retrotranscription of total RNA, followed by nested PCR. Assembly of these 5' and 3' sequences with the first PCR product

revealed that the *TmKHC* gene encoded a protein of 1145 amino acids that had 59 % identity with *TbKHC1* at protein level (Fig. 5). The protein N-terminal domain contained the highly conserved kinesin motor domain with a typical ATP binding site.

Anti-*TbKHC1* antibodies block arginase activity induction by *T. musculi* and parasite growth

When anti-*TbKHC1* monoclonal antibody was added to *T. musculi*-macrophage co-cultures, both arginase induction and parasite growth were markedly reduced as compared to the isotype control antibody (Fig. 6A).

In addition, when anti-*TbKHC1* antibody was injected intraperitoneally into mice on day 2 post-*T. musculi* infection, the parasite load strongly decreased, whereas the isotype control antibody treatment had no effect (Fig. 6B). Arginase activity also decreased in macrophages from 13 day-infected mice in the anti-*TbKHC1* antibody treated group (38 ± 11 mU/10⁵ macrophages), compared to those from isotype control (117 ± 20 mU/10⁵ macrophages) or saline groups (125 ± 18 mU/10⁵ macrophages).

Mannose treatment inhibits both parasite growth and arginase induction

In murine trypanosomiasis, C-type lectin receptor expression increases in macrophages (6). The number of peritoneal macrophages was increased in *T. musculi* infected mice (14). In peritoneal macrophages from 14-day infected mice, CD206 (*Mrc1*, mannose receptor, MR) expression levels increased fourfold compared to control macrophages (Fig. 7) whereas CD209b (*SIGN- R1*) expression was unchanged (not shown).

Mannose or galactose was added to parasite-macrophage co-cultures. Mannose inhibited parasite growth in a dose-dependent manner, whereas galactose had only a marginal effect (Fig. 8). Supplementing MCM with mannose or galactose just before adding it to purified parasite cultures had no effect on parasite growth, indicating the absence of a direct toxic effect of sugars on parasite (data not shown).

In addition, mannose had a more marked inhibitory effect than galactose on parasite- and ESF- induced arginase activity (Fig. 8B).

Intraperitoneal injection of mannose from day 1 post-*T. musculi* infection dramatically decreased the parasite load in mice, whereas galactose had a less pronounced effect (Fig. 9). At 14 days post-infection, macrophage arginase activity had decreased in mice receiving mannose (34 ± 15 mU/10⁵ cells), compared to infected mice receiving saline (122 ± 17 mU/10⁵ cells) or galactose (88 ± 21 mU/10⁵ cells).

Mannose receptor deficiency improved *T. musculi* infection control

In *Mrc1* KO mice, *T. musculi* parasitemia was reduced 10-fold compared to wild-type mice,

whereas, in *SIGN-R1* KO mice, parasitemia decreased marginally compared to the controls (Fig 10).

Taxonomic positions of trypanosome KHC

Only eight GenBank sequences have fulfilled the selection criteria (i. e. more than 50% of both homology and covering from sequences belonging to the selected species) namely, 1 *T. b. gambiense*, 1 *T. equiperdum*, 1 *T. congolense*, 1 *T. vivax*, 1 *T. grayi*, 2 *T. cruzi* and 1 *T. c. marinkellei*. There were no protein sequence of KHC for *T. b. rhodesiense*, *T. evansi* and *T. theileri*. The protein sequences of *T. brucei*, *T. musculi* and *T. theileri* KHC of 1111, 1148 and 1123 amino acids respectively, were aligned with these eight GenBank sequences and after elimination of the non-common parts at both ends, we obtained a final alignment of 1071 amino acid sites including gaps. The maximum likelihood tree is shown on Fig. 11. *TbKHC1* (strain TREU927 of *T. b. brucei*, GenBank ref. XP_845556) presented an identity of 100% with *T. equiperdum* (SCU65329), 99% with *T. b. gambiense* (XP_011774228) and 78% with *T. congolense* (CCC91128). KHC of *T. musculi* presented 75-76% identity with the strains belonging to the *T. cruzi* clade and less than 66% for the other species whereas KHC of *T. theileri* presented its maximum identity (69%) with *T. grayi* (XP_009307339) and less than 65% with the other species.

Discussion

This study revealed that *T. musculi* ESF induced macrophage arginase 1 activity via a pathway involving mannose-binding receptor(s), promoting parasite growth. A monoclonal antibody specific to the kinesin heavy chain *TbKHC1*, an orphan kinesin present in ESF from *T. brucei*, inhibited arginase activity and reduced *T. musculi* load, both *in vitro* and *in vivo*, suggesting that the *TbKHC1* homolog identified in *T. musculi*, with 59% amino acid identity to *TbKHC1*, was the active component of *T. musculi* ESF. However, whereas *TbKHC1* facilitates *T. brucei* parasitemia via the SIGN-R1 receptor (11), the MR receptor was apparently the main target of *T. musculi* ESF. This suggested that kinesin heavy chain-related proteins played similar roles in promoting infection in two distant trypanosomes, via macrophage arginase induction, following distinct C-type lectin receptor targeting.

Macrophages have been widely used as feeder layer cells to favor parasite cell proliferation *in vitro*. Moreover, macrophage conditioned medium (MCM) has previously been used to promote trypanosome growth *in vitro* (23). Adding an arginase inhibitor, that had no direct effect on trypanosomes, to MCM, reduced its parasite growth-promoting activity, which was restored by L-ornithine supplementation, although synergy with the various components of fetal calf serum cannot be ruled out. The essential requirement for L-ornithine is linked to the absence of a functional enzyme arginase in trypanosomes (12), resulting in their dependence on host arginase activity for polyamine and trypanothione synthesis, essential for parasite survival, growth, and differentiation (7, 27). Di-fluoromethylornithine, a structural analogue of L-ornithine, is used alone or, more recently, in combination with nifurtimox, as an effective drug in human African trypanosomiasis (HAT) (28). However, its administration is difficult and requires large quantities of intravenously-injected fluids, which limits its use in remote areas. It would, therefore, be useful to find easier ways to target polyamine synthesis, including delivery of cytotoxic polyamine analogues, to improve resistance to trypanosome infection. Alternatively, inhibitors of the pathway triggering arginase activity are expected to reduce parasite load in infected animals, suggesting that strategies targeting trypanosome ESF would be useful for increasing resistance to trypanosomiasis.

Parasites have to adapt and develop in successive hosts, by modulating various host environments and defense mechanisms. Communication between host cells and parasites may take the form of cell-cell contact, soluble factors, and/or extracellular vesicles (exosomes or ectosomes) from parasites, involving membrane receptors of host cells. C-type lectin receptors, expressed in large quantities by dendritic cells and macrophages, play important roles in numerous basic phenomena, as well as various aspects of the immune

response. These receptors induce highly diverse immune responses to pathogens (29). They are involved in protection against various fungi, such as *Cryptococcus neoformans* (30). Several pathogens exploit these receptors to suppress an efficient immune response (31). Distinct C-type lectin receptors can contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*, a parasite related to trypanosomes (32). The MR binds to many microorganisms, mostly intracellular, coated with carbohydrates, including viruses, bacteria, fungi, and parasites (33). We showed here that *T. musculi* KHC1, a secreted kinesin, induced arginase via Mrc1, upregulated in macrophages from *T. musculi*-infected mice. This arginase induction was inhibited by a monoclonal antibody directed to *TbKHC1* (11). In mice infected with *T. cruzi*, a parasite related to *T. musculi*, mannose receptor expression was upregulated in macrophages from *T. cruzi*-infected mice at 13 and 15 days post-infection. The *T. cruzi* antigen cruzipain enhanced mannose receptor recycling, which favored arginase induction and *T. cruzi* survival in macrophages. Moreover, receptor blockade decreased arginase activity and parasite growth in *T. cruzi*-infected mice (34). All these data highlighted the importance of arginase induction for extra- and intracellular trypanosomes and identified the parasite molecules and host receptors involved.

ESF from *Leishmania infantum*, a parasite related to trypanosomes, elicited a protective immune response in dogs, their natural hosts (35). In southwestern Europe, at least 2.5 million dogs are probably infected with *L. infantum* and involved in its transmission to humans (36). This *Leishmania* ESF-based vaccine, which provides protection by inducing a Th1-dominant immune response and an appropriate specific antibody response, has proved its efficacy in field conditions and is now marketed (37). ESF from trypanosomes are involved in virulence/pathogenicity according to parasite strains, which induce macrophage arginase as a function of their virulence (19). However, their contents are poorly known. A monoclonal directed to *TbKHC1* reduced parasite load in *T. musculi*-infected mice. This indicated that a homolog to *TbKHC1* was present in *T. musculi* and possessed similar properties, such as macrophage arginase induction. Moreover, sequence analysis revealed the presence of homologs of this gene in other trypanosomes, including pathogens affecting humans, causing African trypanosomiasis (sleeping sickness) or Chagas disease, and animals, reducing production and increasing morbidity and mortality in livestock. It is worth noting that the hierarchical structure of the KHC phylogenetic tree was consistent with previous reports on other markers: monophyly of *T. cruzi* and *T. brucei/T. equiperdum* and intermediary positions for the others species making KHC as a potential phylogenetic marker for trypanosomes (38, 39).

The dysregulation of host L-arginine inducible metabolism by ES represents an effective parasite mechanism to hamper host immune response and modify host molecule production to favor parasite invasion and growth. Preventing this host metabolism dysregulation by immunization against ES active components or locking partner host molecules is a promising approach. The presence of the C-terminal domain allows cruzipain of *T. cruzi* to circumvent immune response to N-terminal domain and plays vital roles during *T. cruzi* life cycle, including host arginase induction (40, 41). C-terminal domain deletion in cruzipain leads to an efficient immune response against N-terminal domain with leads to a reduced parasite load after *T. cruzi* challenge (40). In this context, a selective targeting of *TbKHC1* kinesin heavy chain homologs in trypanosomiasis deserves further investigation. Antigenic variations in surface glycoproteins hamper vaccination against African trypanosomiasis. Conserved epitopes in nonvariant antigens may be selected and combined, then associated with an adjuvant in an appropriate vaccine formulation to induce adequate immune responses (42, 43).

Acknowledgments

We thank Patricia Nabos for animal care and Vincent Pitard and Santiago Gonzalez of the cytometry platform of the University of Bordeaux. We also thank Dr. Alasdair Ivens and Prof. Keith Matthews at the University of Edinburgh for providing *T. theileri* genome sequence information.

References

1. Green, S. J., M. S. Meltzer, J. B. Hibbs, Jr., and C. A. Nacy. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144: 278-283.
2. Vincendeau, P. and S. Daulouède S. 1991. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol.* 146: 4338-4343.
3. Bogdan, C. 2015. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.* 36: 161-178.
4. Gobert, A. P., S. Daulouède, M. Lepoivre, J. L. Boucher, B. Bouteille et al. 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect. Immun.* 68: 4653-4657.
5. Namangala, B., P. De Baetselier, W. Noël, L. Brys and A. Beschin. 2001. Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *J. Leukoc. Biol.* 69: 387-396.
6. Raes, G., L. Brys, B. K. Dahal, J. Brandt, J. Grooten, F. Brombacher, G. Vanham, W. Noël, P. Bogaert, T. Boonefaes et al. 2005. Macrophage galactose-type C-type lectins as novel markers for alternatively activated macrophages elicited by parasitic infections and allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 77: 321-327.
7. Flohé, L. 2012. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* 302: 216-220.
8. Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica and M. Locati. 2013. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* 229: 176-185.
9. Nzoumbou-Boko, R, M. Dethoua, F. Gabriel, A. Buguet, R. Cespuoglio, P. Courtois, S. Daulouède, B. Bouteille, S. Ngampo, G. Mpandzou, et al. 2013. Serum arginase, a biomarker of treatment efficacy in human African trypanosomiasis. *J. Clin. Microbiol.* 51: 435 2379-2381.
10. Duleu, S., P. Vincendeau, P. Courtois, S. Semballa, I. Lagroye, S. Daulouède, J. L. Boucher, K. T. Wilson, B. Veyret and A. P. Gobert. 2004. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J. Immunol.* 172: 6298-6303.
11. De Muylder, G., S. Daulouède, L. Lecordier, P. Uzureau, Y. Morias, J. Van Den Abbeele, G. Caljon, M. Hérin, P. Holzmuller, S. Semballa, et al. 2013. A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *PloS Pathog.* 9(10):e1003731. doi: 10.1371/journal.ppat.1003731.

12. Hai, Y., E. J. Kerkhoven, M. P. Barrett and D. W. Christianson. 2015. Crystal structure of an arginase-like protein from *Trypanosoma brucei* that evolved without a binuclear manganese cluster. *Biochemistry*. 54: 458-71.
13. Viens, P., G. A. T. Targett, R. Leuchars, and A. J. S. Davies. 1974. The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma muscili*. I. Initial control of the infection and the effect of T cell deprivation. *Clin. Exp. Immunol.* 16: 279-293.
14. Vincendeau, P., A. Caristan, and R. Pautrizel. 1981. Macrophage functions during *Trypanosoma muscili* infection in mice. *Infect. Immun.* 34: 378-381.
15. Vincendeau, P., M. Daëron, and S. Daulouède. 1986. Identification of antibody classes and Fc receptors responsible for phagocytosis of *Trypanosoma muscili* by mouse macrophages. *Infect. Immun.* 53: 600-605.
16. Albright, J.W., Pierantoni M and Albright JF. 1990. Immune and nonimmune regulation of the population of *Trypanosoma muscili* in infected host mice. *Infect. Immun.* 58: 1757- 1762.
17. Krampitz, H. E. 1969. Verbreitung wirt-parasit-beziehungen und vermehrung sizilianischer Stämme von *Trypanosoma (Herpetosoma) duttoni* Thiroux.1905 (Protozoa, *Trypanosomatidae*). *Z. Parasitenkd.* 32: 297-315.
18. Lanham, S. M. 1968. Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature*. 218(5148): 1273-1274.
19. Holzmüller, P., D. G. Biron, P. Courtois, M. Koffi, R. Bras-Gonçalves, S. Daulouède, P. Solano, G. Cuny, P. Vincendeau and V. Jamonneau. 2008. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.*10: 79-86.
20. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680–685.
21. Semballa, S., M. C. Okomo-Assoumou, P. Holzmüller, P. Büscher, S. Magez, J. L. Lemesre, S. Daulouède, P. Courtois, M. Geffard and P. Vincendeau. 2007. Identification of a tryptophan-like epitope borne by the variable surface glycoprotein (VSG) of African trypanosomes. *Exp. Parasitol.* 115: 173-180.
22. Bras-Gonçalves, R., E. Petitdidier, J. Pagniez, R. Veyrier, P. Cibrelus, M. Cavaleyra, S. Maquaire, J. Moreaux and J. L. Lemesre. 2014. Identification and characterization of new *Leishmania* promastigote surface antigens, LaPSA-38S and LiPSA-50S, as major immunodominant excreted/secreted components of *L. amazonensis* and *L. infantum*. *Infect. Genet. Evol.* 24: 1-14.

23. Albright, J.W. and J.F. Albright. 1980. *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi* in cell free medium conditioned by rodent macrophages and mercaptoethanol. *Int. J. Parasitol.*10: 137-142.
24. Vincendeau, P., B. Guillemain, S. Daulouède, and C. Ripert. 1985. *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi*: requirements of cells and serum-free culture medium. *Int. J. Parasitol.* 16: 387-390.
25. Corraliza, I. M., M. L. Campo, G. Soler and M. Modolell. 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174: 231-235.
26. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
27. Fairlamb, A. H. and A. Cerami 1992 Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.*46: 695-729.
28. Priotto, G., S. Kasparian, W. Mutombo, D. Ngouama, S. Ghorashian, U. Arnold, S. Ghabri, E. Baudin, V. Buard, S. Kazadi-Kyanza et al. 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet.* 374 (9683): 56-64.
29. Van den Berg, L. M., S. I. Gringhuis and T. B. Geijtenbeek. An evolutionary perspective on C-type lectins in infection and immunity. 2012. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253: 149-58.
30. Wüthrich, M., Deepe G.S., Jr. and Klein B. 2012. Adaptive immunity to fungi. *Annu. Rev. Immunol.* 30: 115-148.
31. Engering, A., T. B. Geijtenbeek and Y. van Kooyk. 2002 Immune escape through C-type lectins on dendritic cells. *Trends Immunol.* 23: 480-485
32. Lefèvre, L., G. Lugo-Villarino, E. Meunier, A. Valentin, D. OLAGNIER, H. Authier, C. Duval, C. Dardenne, J. Bernad, J.L Lemesre et al. 2013. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity.* 38: 1038-1049.
33. Martinez-Pomares, L. 2012. The mannose receptor. *J. Leukoc. Biol.* 92: 1177-1186.
34. Garrido, V. V., L. R. Dulgerian, C. C. Stempin and F. M. Cerbán. 2011. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. *Int. J. Biol. Sci.*7: 1257-1272.
35. Lemesre, J. L., P. Holzmüller, R. Bras-Gonçalves, G. Bourdoiseau, C. Hugnet, M. Cavaleyra, and G. Papierok. 2007. Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine.* 25: 4223-4234. 513

36. Athanasiou, L. V., V. I. Kontos, M. N. Saridomichelakis, T. S. Rallis and A. Diakou. 2012. A cross-sectional sero-epidemiological study of canine leishmaniasis in Greek mainland. *Acta Trop.* 122: 291–295.
37. Bourdoiseau, G. Hugnet, C. Bras-Gonçalves, R. Vezilier, F. Petit-Didier, E. Papierok, G. and Lemesre J.L. 2009. Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAp-MDP vaccinated protected dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128: 71–78.
38. Stevens J. R. and W. Gibson W. 1999. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol. Today.* 15:432-7.
39. Da Silva, F. M., H. Noyes, M. Campaner, A. C. Junqueira, J. R. Coura, N. Anez, J. J. Shaw, J. R. Stevens and M. M. Teixeira. 2004. Phylogeny, taxonomy and grouping of *Trypanosoma rangeli* isolates from man, triatomines and sylvatic mammals from widespread geographical origin based on SSU and ITS ribosomal sequences. *Parasitology* 129(Pt 5): 549-561.
40. Cazorla S. I., F. M. Frank, P. D. Becker, M. Arnaiz, G. A. Mirkin, R. S. Corral, C. A. Guzmán and E. L. Malchiodi. 2010. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cystein proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Infect. Dis.* 202:136-144.
41. Scharfstein J. and A. P. Lima. 2008. Roles of naturally occurring protease inhibitors in the modulation of host cell signaling and cellular invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Subcell Biochem.* 47: 140–154.
42. La Greca, F. and S. Magez. 2011. Vaccination against trypanosomiasis: can it be done or is the trypanosome truly the ultimate immune destroyer and escape artist? *Hum. Vaccin.* 7: 1225-1233.
43. Gimenez, AM, K. S. Françoso, J. Ersching, M.Y. Icimoto, V.Oliveira, A. E. Rodriguez, L. Schnittger, M. Florin-Christensen, M. M. Rodrigues and I. S. Soares. 2016. A recombinant multi-antigen vaccine formulation containing *Babesia bovis* merozoite surface antigens MSA-2a1, MSA-2b and MSA-2c elicits invasion-inhibitory antibodies 540 and IFN- γ producing cells. *Parasit. Vectors.* 9: 577.

Footnotes

E.P. acknowledges funding from PAI P7/41 and ERC grant 669007-APOLs. A.B. is funded by PAI P7/41. R.N.B. and S.S. thank le Service de coopération et d'action culturelle de l'Ambassade de France à Bangui, and l'Association pour le développement de la recherche en parasitologie et santé tropicale for continuous support.

Address correspondence

Philippe Vincendeau, University of Bordeaux, UMR 177 IRD/CIRAD INTERTRYP, Laboratoire de Parasitologie, BP 43, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France.

Figure legends

Figure 1

Parasitemia, arginase activity, and arginase expression in *T. musculi*-infected mice.

(A) Parasitemia and arginase activity in macrophages at day 5, 7, 10, 13, 15, 20, 24 post-infection. Day 0 represents arginase activity of macrophages from uninfected mice (control macrophages). Data are the mean \pm SEM of 8 mice. (B) mRNA expression levels of arginase 1 and arginase 2 in macrophages were assessed by real-time PCR. Data are standardized to β -actin and presented as fold increase versus naïve mice. Data are the mean \pm SEM from 4 mice.

Figure 2

Arginase activity in macrophages co-cultured *in vitro* with *T. musculi*.

Macrophages were co-cultured for 3 days with *T. musculi* (*Tm*), *Tm* in an insert, or ESF, or grown in culture medium (CM) before measuring arginase activity. Data are the mean \pm SEM from 5 separate experiments. *** $p < 0.001$

Figure 3

Induction of arginase activity favors *in vitro* parasite growth

Parasites were counted after a 3-day-co-culture with macrophages. Parasite growth was assessed as percentage compared to growth in presence of controls (co-cultures of parasite and macrophages from naïve mice). The effects of the arginase inhibitor BEC with or without L- ornithine on parasite growth was assessed. A 2-day macrophage culture without parasites produced a macrophage conditioned medium (MCM), able to promote parasite growth without cells. MCM promoted parasite growth compared to control medium. Data are the mean \pm SEM from 4 separate experiments (Fig. 2). *** $p < 0.001$

Figure 4

T. musculi express a *TbKHC1* cross-reactive protein.

After SDS-Page and blotting, *T. musculi* ESF were incubated with anti-*TbKHC1* (1/200) (A) or IgG2b isotype control (1/200) antibody (B). Peroxidase-labeled goat anti-mouse IgG was added as secondary antibody (1/5000).

Figure 5

Protein sequence alignment of KHC genes in *T. brucei brucei*, *T. musculi* and *T. theileri*. Kinesin motor domains with ATP binding sites (■■■) and the start of the shorter cDNA recognized by anti-*TbKHC1* in *T. brucei brucei* (▼) were indicated.

Figure 6

In vitro and *in vivo* parasite growth in presence of anti-*TbKHC1*

(A) Parasites were counted after a 3-day co-culture with macrophages in presence of anti-*TbKHC1* or IgG2b isotype control antibody (3 µg/200 µL). Data are the mean ± SEM from 4 separate experiments. ** $p < 0.01$. (B) Mice were injected intraperitoneally with physiological saline (500 µL), anti-*TbKHC1*, or IgG2b isotype control antibody (250 µg in 500 µL saline) at day 2 post-*T. musculi* infection. Parasitemia at days 5, 7, 10, 13, 15, 20, 24 post-infection. Data are the mean ± SEM from 5 mice.

Figure 7

Mannose receptor was expressed on macrophages from *T. musculi*-infected mice. Peritoneal cells (10⁶/ml) from 14-day infected mice and from non-infected mice were labeled with APC- rat anti-mouse CD14 and FITC-anti-mouse CD206 antibody. The percentage of CD14⁺ CD206⁺ cells was determined. Data are the mean ± SEM from 6 mice. *** $p < 0.001$

Figure 8

(A) Effect of sugars on *in vitro* *T. musculi* proliferation.

Parasite growth was assessed after 3 days in parasite-macrophage co-cultures containing mannose or galactose as a percentage compared to growth in presence of controls (macrophages from naive mice without sugars). Data are the mean ± SEM from 6 culture wells. ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

(B) Inhibition of parasite and ESF induced arginase activity *in vitro* by sugars.

Macrophages were cultured in culture medium containing parasites or ESF and supplemented with mannose or galactose (10mM). Arginase activity was assessed 72 hours later. Data are the mean ± SEM from 6 culture wells. *** $p < 0.001$, ns non-significant.

Figure 9

Effect of sugars on *T. musculi* parasitemia.

Parasitemia was assessed in mice receiving intraperitoneal injections of physiological saline, mannose, or galactose three times /day from day 1 post-infection. Data are the mean ± SEM from 6 mice.

Figure 10

MR-deficient mice exhibit improved parasite control capacity. Parasitemia was monitored in various *T. musculi*-infected mice: *Mrc1* KO and wild-type C57BL/6 (WT (B6)) mice, and in

SIGN-R1 KO BALB/c and control (Ctrl *SIGN-R1*) mice. Data are the mean \pm SEM of 4 individual mice in a representative experiment, repeated 3 times.

Figure 11

KHC phylogenetic tree

Maximum Likelihood tree based on the Le_Gascuel_2008 model. The tree with the highest log likelihood (-9652,6026) is shown. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0,6297)). The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 11 amino acid sequences. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6. The numbers at the nodes are the bootstrap values obtained using 100 replications. The leaf texts are the NCBI reference followed to the species name and to the strain name when available.

Figure 1A

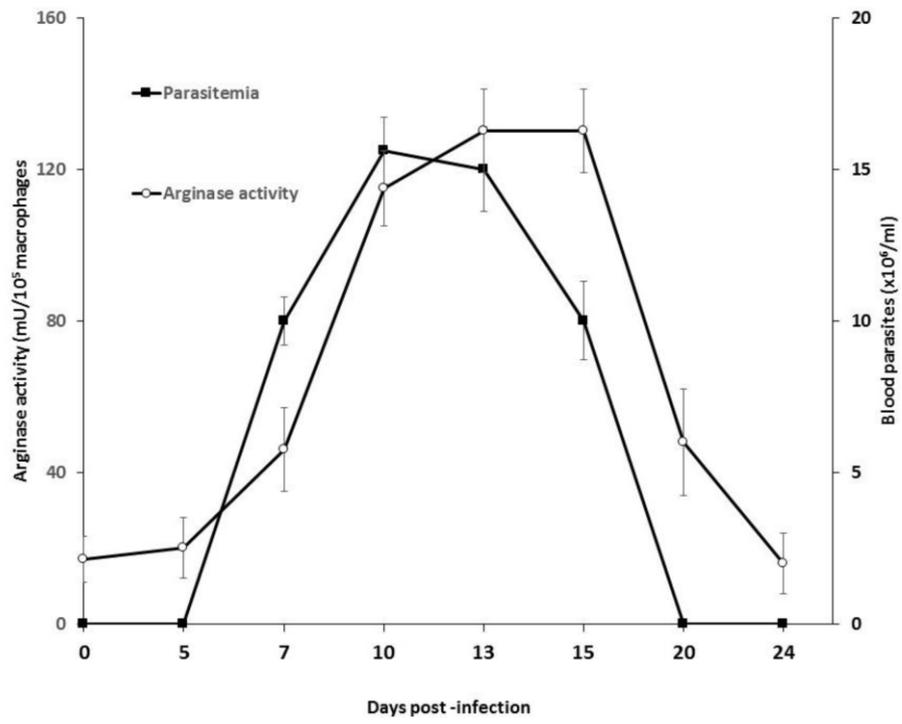


Figure 1B

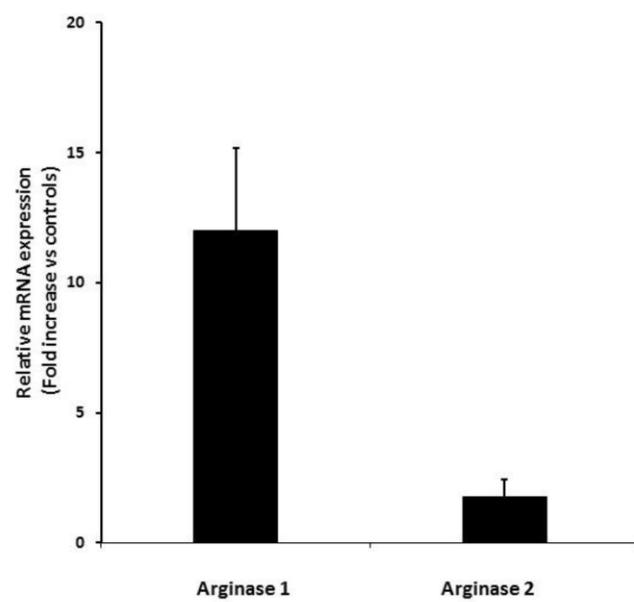


Figure 2

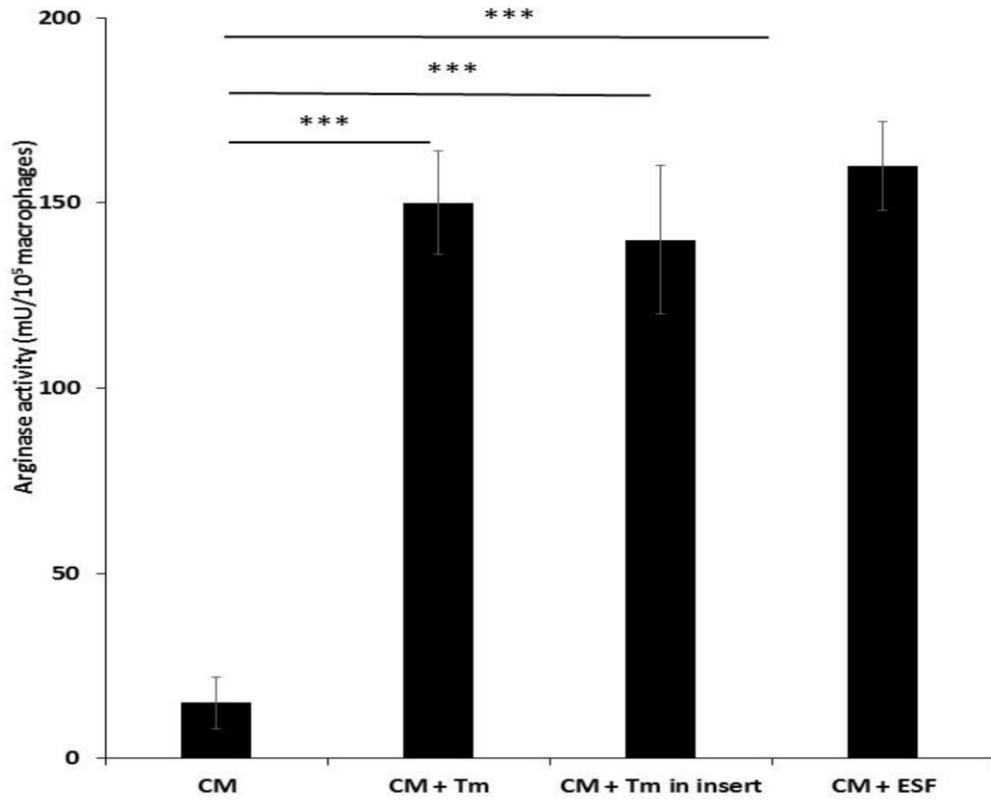


Figure 3

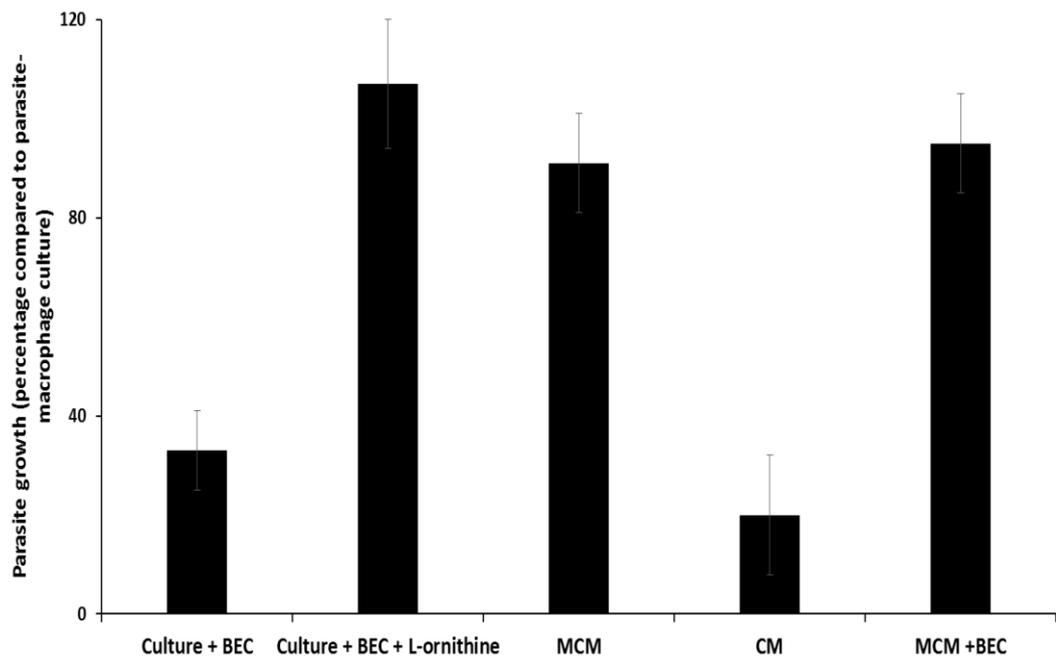


Figure 4

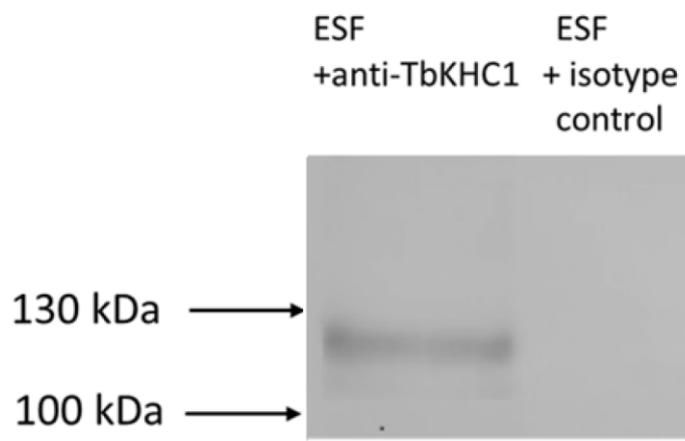


Figure 6A

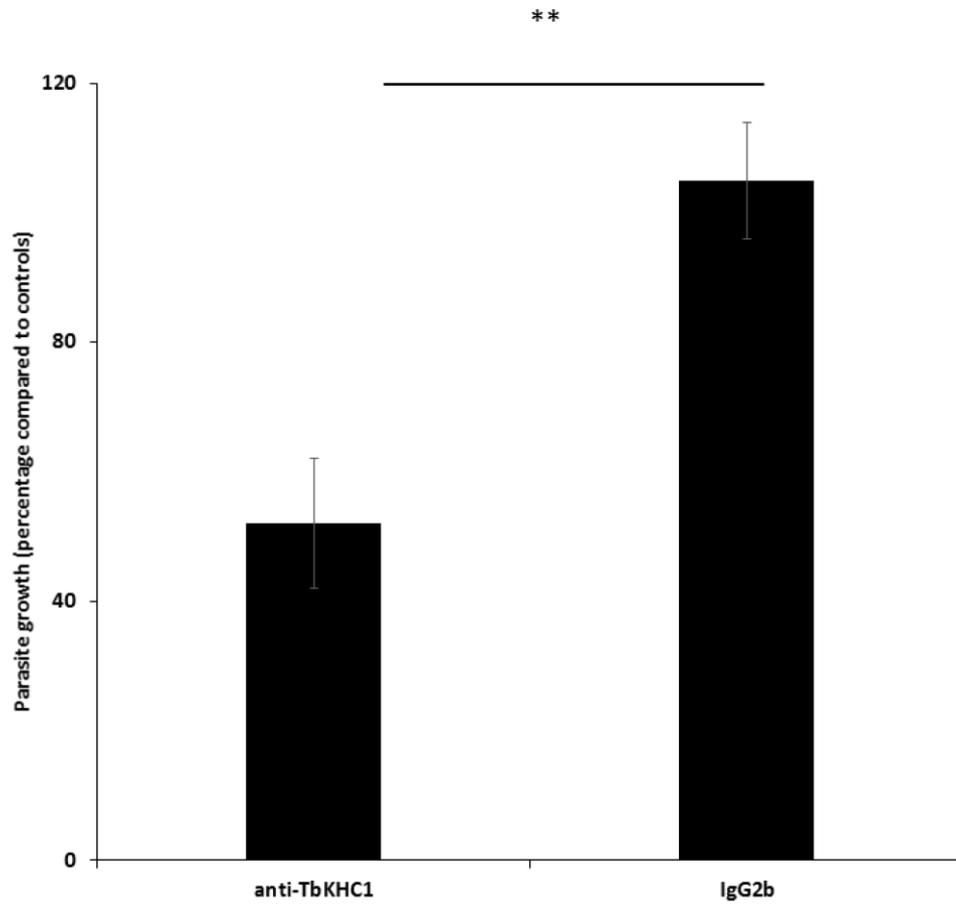


Figure 6B

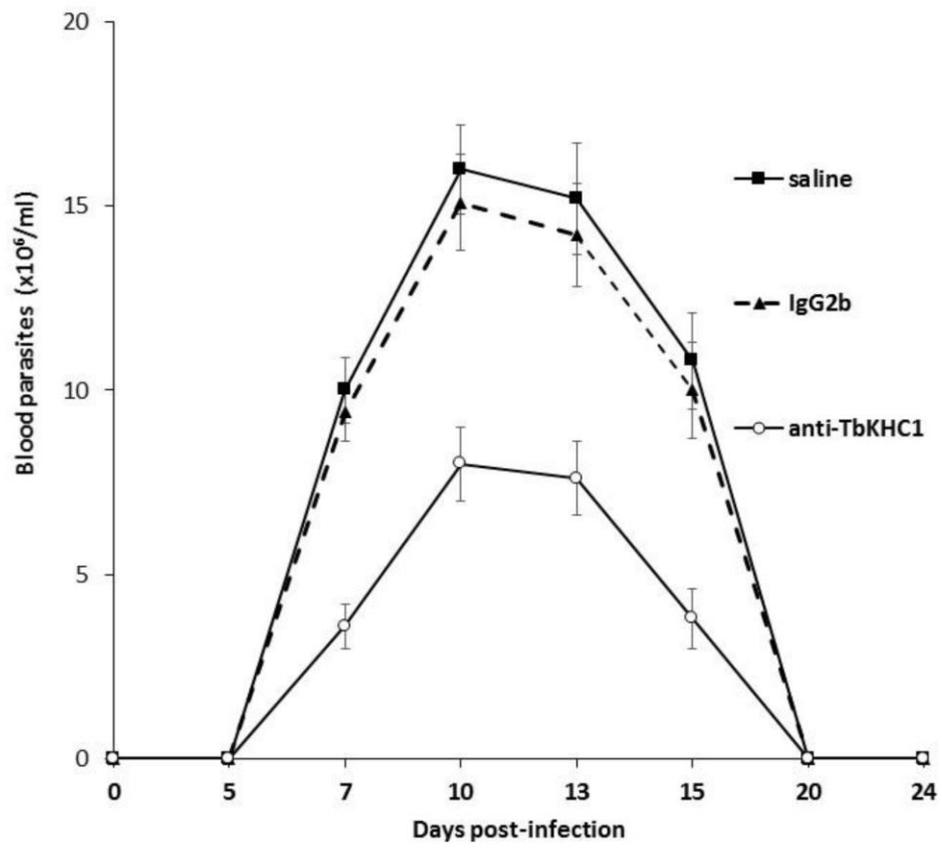


Figure 7

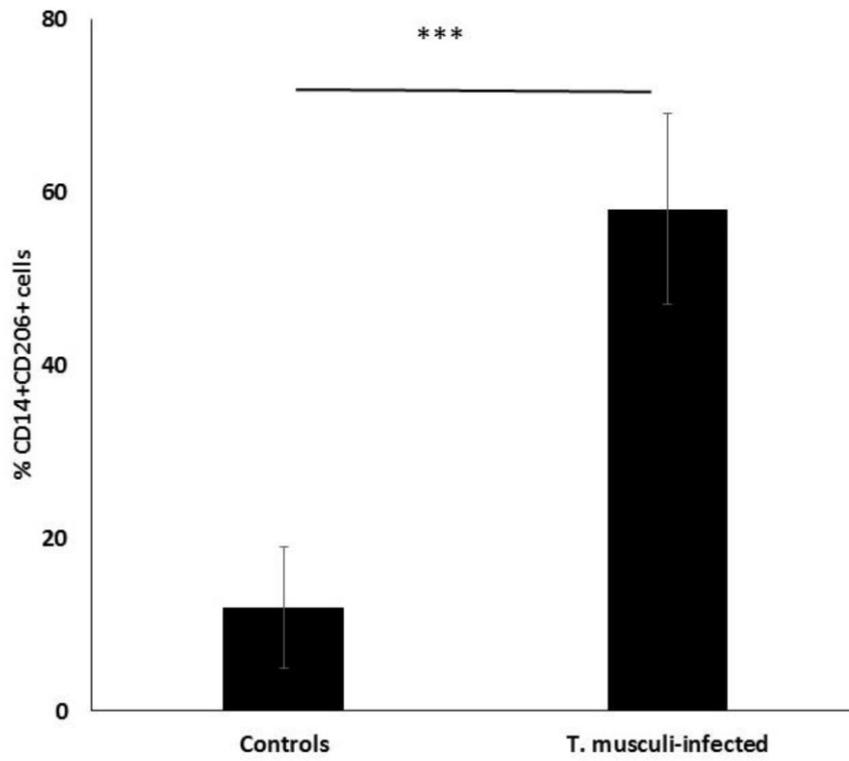


Figure 8A

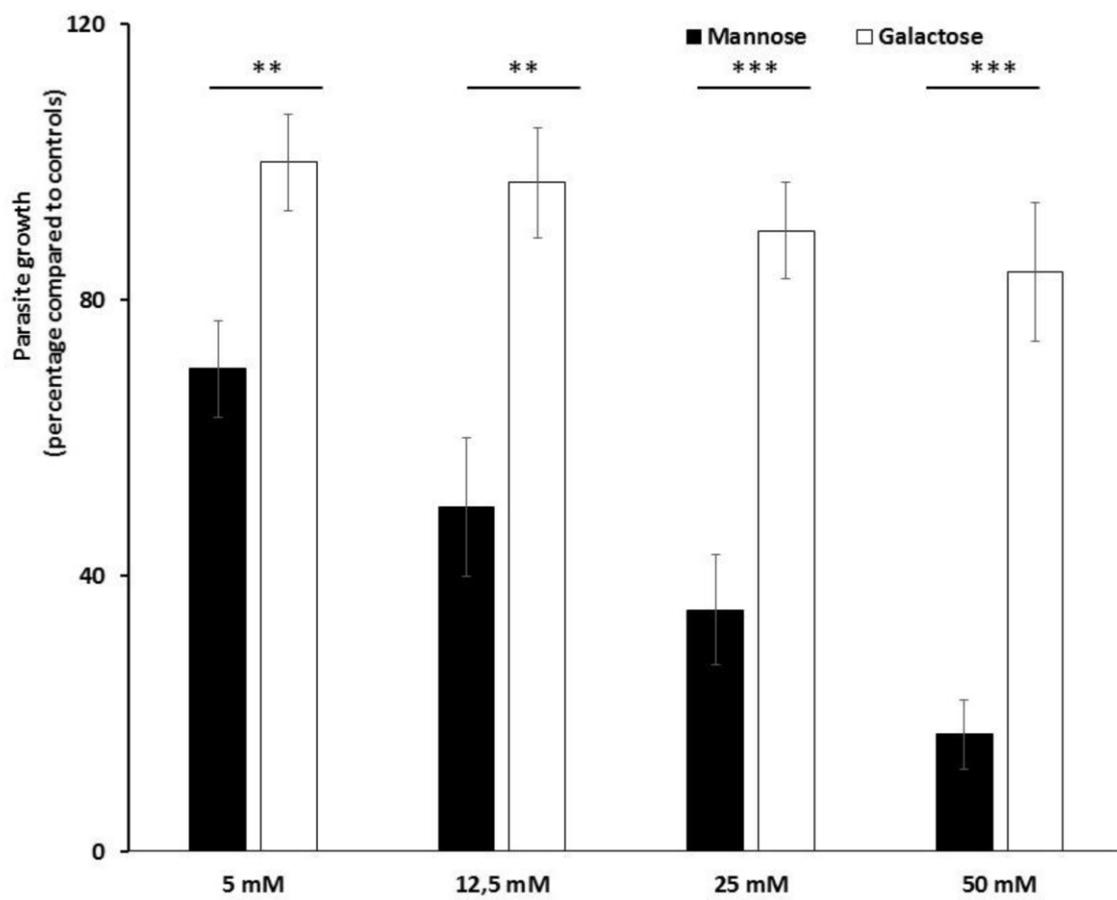


Figure 8 B

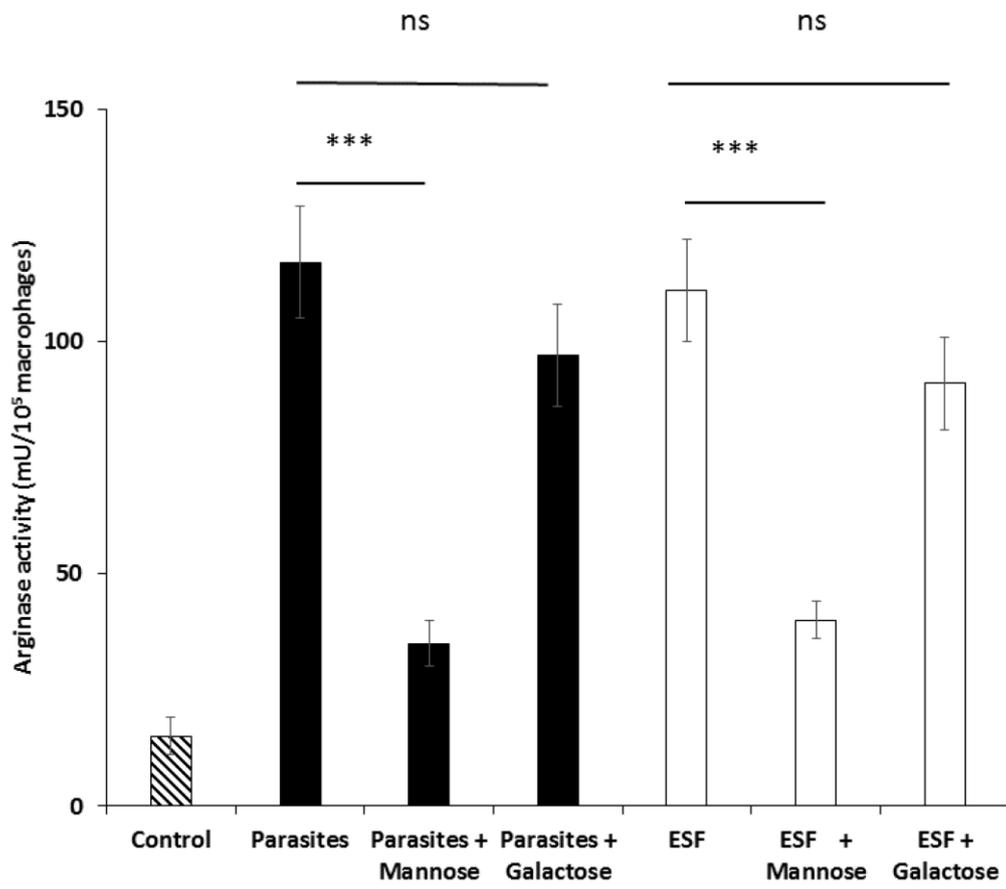


Figure 9

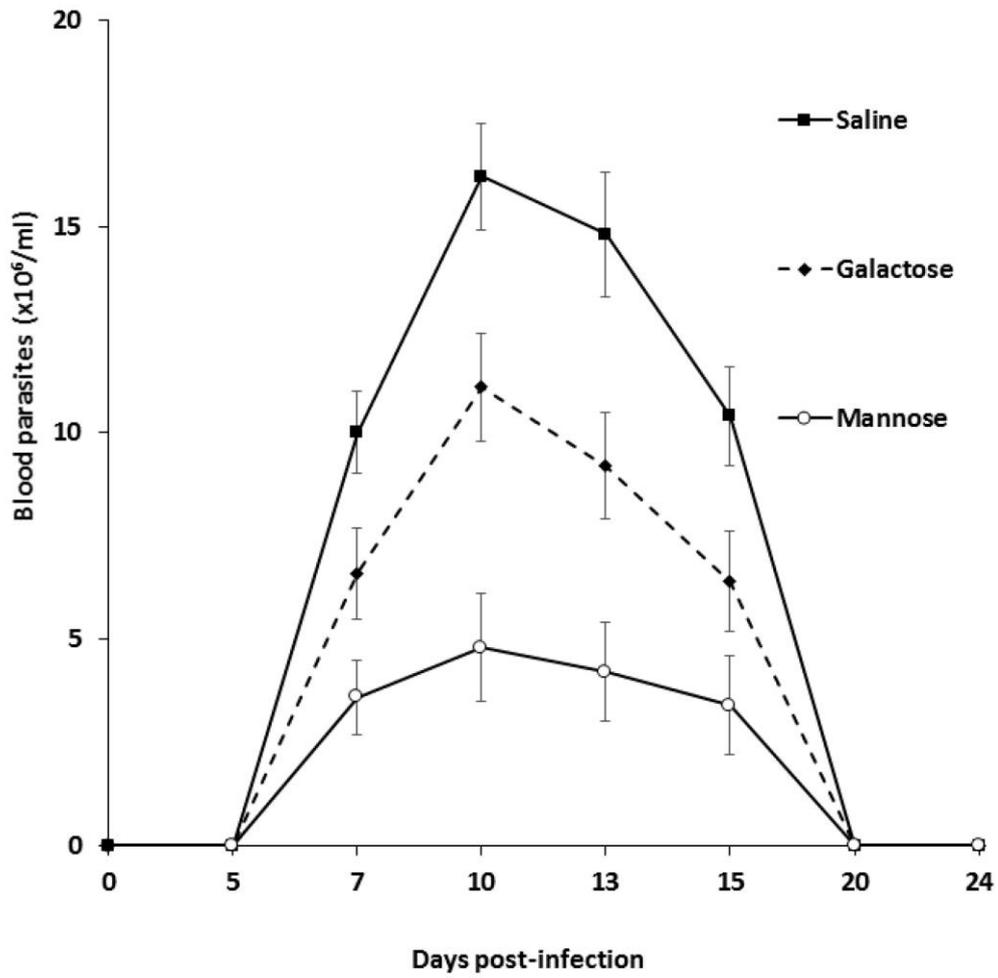


Figure 10

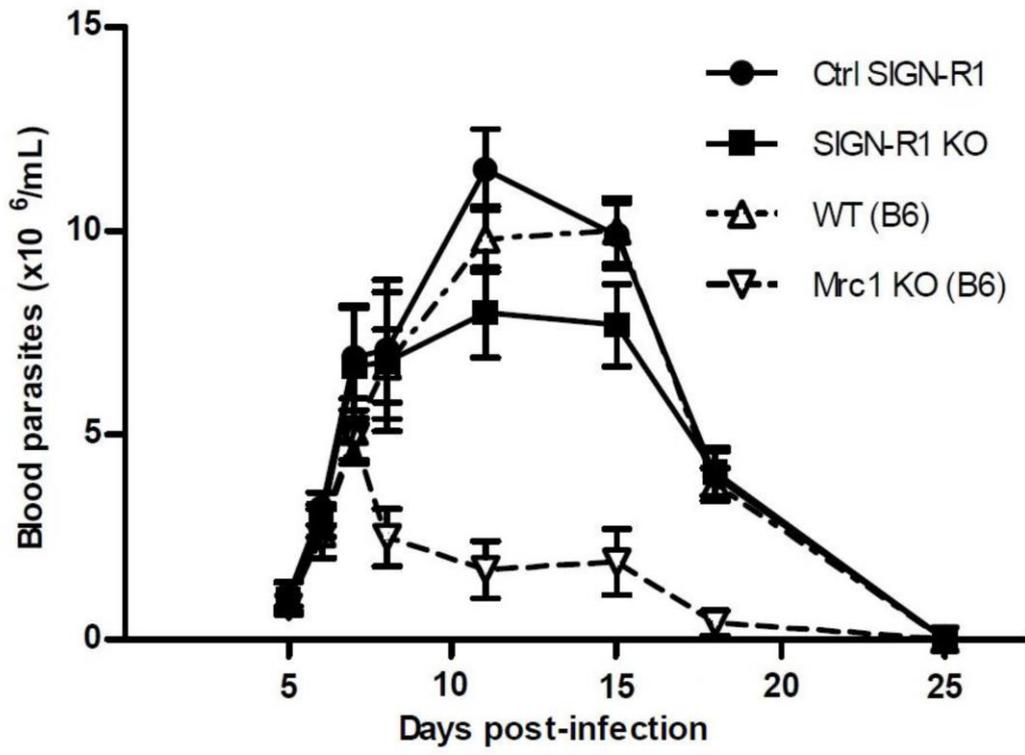
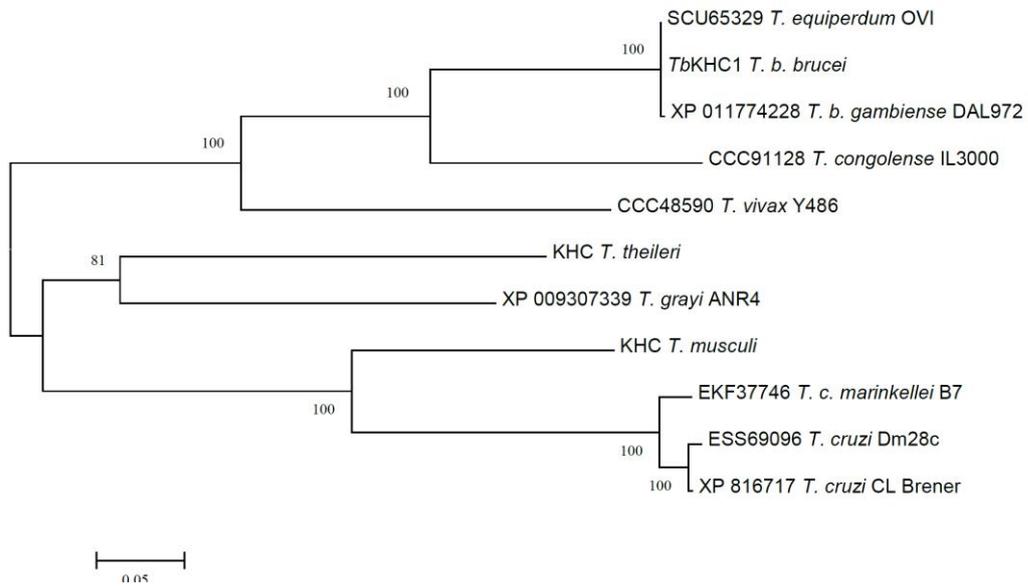


Figure 11



Discussion générale

4 Discussion générale

La THA est une infection provoquée par un protozoaire du genre *Trypanosoma*. L'évolution spontanée de cette maladie se fait en quelques années vers une cachexie terminale et le décès. Le traitement repose sur des médicaments parfois anciens, qui peuvent causer des effets indésirables. La guérison est finalement obtenue dans 80 à 90% des cas. Cependant, la moitié des décès sont imputables à une iatrogénie, notamment par encéphalopathie arsénicale. L'usage du NECT a amélioré la prise en charge des patients en phase d'encéphalite. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles afin d'améliorer l'efficacité et la tolérance des traitements dans la THA demeure cependant nécessaire. Deux caractéristiques de la THA, les insuffisances des traitements actuellement disponibles et les dérégulations du système immunitaires, ont orienté mes recherches.

Dans un premier travail, nous avons étudié CYP51 (stérol 14 α -déméthylase), une cible potentielle, par RNAi. Nous avons démontré le caractère essentiel de cette enzyme pour le parasite, ainsi que les conséquences de sa déplétion sur la cytodierèse. De plus, la survie de souris infectées par la souche CYP51^{RNAi} induite était prolongée, montrant l'implication de CYP51 dans la virulence. La combinaison du posaconazole, un dérivé triazolé inhibant CYP51, à l'éflornithine a montré un effet similaire à la combinaison nifurtimox-éflornithine dans un modèle murin. Nos résultats soulignent donc l'intérêt potentiel d'un traitement ciblant CYP51 dans la trypanosomose.

Du fait de l'importance de l'immunodépression dans la THA et de la capacité du trypanosome à échapper au système immunitaire de l'hôte, nous avons étudié, dans un deuxième travail, l'effet de *T. gambiense* et de son sécrétome sur des DCs *in vitro*. Nous avons ainsi montré une altération de la maturation des DCs induite par le LPS en présence du sécrétome. Nous avons également montré qu'une des protéines de ce sécrétome, *TbKHC1*, est exprimée par différentes espèces de trypanosomes. Elle est impliquée dans l'induction de l'arginase macrophagique chez la souris, un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Ces travaux apportent des éléments pour une meilleure compréhension des phénomènes immunopathologiques rencontrés.

CYP51 comme cible thérapeutique

Plusieurs résultats convergents nous ont permis de confirmer l'importance de CYP51 chez *T. brucei*. Nous avons observé que cette enzyme de la voie de biosynthèse des stérols est exprimée chez différentes souches du parasite, y compris des souches virulentes. En utilisant l'ARNi, nous avons montré le caractère essentiel de CYP51 dans la forme sanguine de *T. brucei*. La diminution de l'expression de CYP51 par l'ARNi est à l'origine d'une réduction de la croissance puis de la mort du parasite. De plus, cet effet est réversé par l'addition *in vitro* d'ergosterol, le métabolite final de la voie de biosynthèse. Ceci montre la relation de l'effet observé avec la biosynthèse des stérols. La réduction de la croissance du parasite par l'ARNi est associée à des anomalies morphologiques en culture avec une forte proportion de trypanosomes multiflagellés, suggérant une anomalie de la cytodivision. Nous avons confirmé l'importance de CYP51 *in vivo*. La survie de souris infectées avec la souche expérimentale est prolongée après induction de l'ARNi par la doxycycline. Le posaconazole, un dérivé azolé ciblant CYP51, est actif *in vitro* sur les souches étudiées. Sa combinaison avec l'éflornithine présente un effet comparable au NECT sur la survie des souris infectées.

Certains éléments nécessiteraient cependant d'être précisés. Tout d'abord, nous n'avons pas été en mesure de localiser CYP51 dans le trypanosome. Les résultats que nous avons obtenus par marquage endogène de la forme sanguine du parasite n'ont pas été concluants. Dans les cellules de mammifères, CYP51 a été localisée au niveau du réticulum endoplasmique, comme l'HMG-CoA réductase. Chez *T. brucei*, certains auteurs ont suggéré une localisation au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et/ou dans le réticulum endoplasmique, mais les données sont parcellaires (Niemann *et al.* 2013). La localisation plus précise de CYP51 pourrait être étudiée par marquage de la forme procyclique du trypanosome ou par étude de l'expression de la protéine après fractionnement sub-cellulaire (Rivière *et al.* 2009). De plus, nous avons observé la mort du parasite après 14 jours d'induction de l'ARNi. Ce délai est long comparativement à l'effet de l'ARNi d'autres protéines essentielles chez *T. brucei* (Bonhivers *et al.* 2008). Ceci pourrait suggérer une persistance prolongée de la protéine CYP51, peut-être par persistance de l'ARNm. Des travaux visant à décrire chez *T. brucei* la localisation et le métabolisme

de CYP51 ainsi que les variations de la composition en stérols du parasite seraient d'un grand intérêt.

L'usage des médicaments azolés présente quelques limites. L'apparition de résistances chez les agents fongiques à cette classe de médicaments est un problème majeur. Quatre mécanismes de résistance ont été décrits chez les agents fongiques : (1) l'altération de la cible résultant de mutation(s), (2) la surexpression de la cible, (3) la déviation de la voie de biosynthèse des stérols, (4) l'efflux actif (Xiao *et al.* 2004)(Sanglard *et al.* 2002)(Albarrag *et al.* 2011). Ainsi, des mutations correspondant aux points de contact de la molécule de posaconazole avec l'entrée du tunnel hydrophobe de CYP51 ont été décrites chez différents agents pathogènes comme *A. fumigatus* (Howard *et al.* 2009)(Mann *et al.* 2003) et *C. albicans* (Li *et al.* 2004). De façon remarquable, les points de contact du posaconazole avec les acides aminés de CYP51 de *T. brucei* sont similaires, suggérant la possibilité d'émergence de résistances par des mutations en rapport avec cette région de la protéine (Chen *et al.* 2010). Chez *T. cruzi*, la variabilité d'un seul acide-aminé de CYP51 entre 2 souches peut provoquer des différences d'efficacité d'inhibiteurs de CYP51 (Cherkesova *et al.* 2014). La résistance au kétoconazole, un autre azolé, a été obtenue expérimentalement chez *L. amazonensis* par la surexpression de CYP51 (Andrade-Neto *et al.* 2012). En outre, les azolés présentent une efficacité qui peut être limitée par une mauvaise biodisponibilité. Ceci pourrait avoir comme conséquence de limiter l'efficacité des traitements notamment au niveau de réservoirs parasitaires chez l'hôte (Caljon *et al.* 2016). Les molécules les plus récentes présentent par ailleurs un coût élevé. Différentes stratégies pourraient être envisagées pour pallier à ces limites. L'inhibition combinée de plusieurs enzymes de la voie de biosynthèse des stérols a ainsi été proposée, avec une amélioration de l'efficacité *in vitro* (Haubrich *et al.* 2015). Le développement de meilleurs inhibiteurs du CYP51 des *Trypanosomatidae* pourrait permettre une amélioration de l'efficacité des traitements. Dans ce but, des composés proches des imidazolés ont été identifiés, avec une efficacité *in vitro* et *in vivo* sur *T. cruzi* (Buckner *et al.* 2003). Des inhibiteurs non azolés comportant un motif pyridine ont également été décrits (Hargrove *et al.* 2013). Le composé VNI et ses dérivés sont des inhibiteurs irréversibles non azolés de CYP51 qui ont montré une efficacité *in vivo* et *in vitro* chez *T. cruzi*. (Soeiro *et al.* 2013). Les efficacités de VNI et d'un dérivé VFV ont été démontrées dans des modèles de maladie de Chagas (Lepesheva *et al.* 2015). La

liaison de VNI à CYP51 a également été mise en évidence chez *T. brucei* (Lepesheva *et al.* 2010). Du fait du caractère essentiel de CYP51 chez *T. brucei*, l'intérêt de ces différentes molécules seules ou en combinaisons mérite d'être évalué chez ce parasite.

Implication des cellules dendritiques dans la trypanosomose

Nous avons étudié l'effet du sécrétome de *T. brucei gambiense* sur le phénotype de DCs humaines dérivées des monocytes. Les molécules du sécrétome sont en effet les premières à établir un dialogue moléculaire avec celles de l'hôte et à favoriser l'immuno-dérégulation, caractéristique essentielle des trypanosomoses. Nous avons observé, en cytométrie de flux, que le sécrétome diminue l'expression par les DCs de marqueurs caractéristiques de la maturation induite par le LPS (CD83 et HLA-DR), mais n'a pas d'effet sur les molécules de stimulations (CD80, CD86, CD40, PD-L1), contrairement à des travaux précédents réalisés avec des DCs murines. Nous avons également observé que cette altération de la maturation des DCs s'accompagne de la réduction de production de cytokines, en rapport avec une inhibition de l'activation de ces cellules.

Les altérations observées nécessitent d'être caractérisées avec différentes souches de *T. brucei*, ainsi que dans différentes conditions de stimulation. La participation d'autres types cellulaires, comme les cellules myéloïdes suppressives (*myeloid cell-derived suppressor cells*, MDSCs), qui jouent un rôle important chez l'Homme, doit également être recherchée. La capacité d'endocytose des DCs mérite également d'être évaluée. Enfin, les voies de signalisations mises en jeu ainsi que les conséquences fonctionnelles dans l'orientation de la réponse lymphocytaire T méritent d'être caractérisées.

Implication du sécrétome et de la kinésine *TbKHC1*

La sécrétion de cytokines par les CPA est précoce dans la trypanosomose. Parmi les constituants du sécrétome, certains pourraient être impliqués dans la modulation de cette réponse inflammatoire précoce des DCs et des macrophages. Nous avons montré que l'activité et l'expression de l'arginase macrophagique sont induites lors de l'infection par *T. muscili* chez la souris. Cette induction est médiée par le sécrétome du parasite. Un anticorps monoclonal dirigé contre *TbKHC1*, une kinésine présente dans le sécrétome, inhibe l'induction de l'arginase et la

croissance du parasite. Ces travaux confirment la conservation de la fonction de la kinésine entre *T. brucei* et *T. musculi*. Des analyses bioinformatiques ont montré sa conservation au niveau des espèces du genre *Trypanosoma*. L'induction de l'arginase macrophagique dans la trypanosomose pourrait en outre être en relation avec le récepteur mannose chez la souris. La relation entre l'activité arginase et le récepteur mannose a déjà été soulignée dans d'autres travaux dans des modèles d'infection. En particulier, il a été montré que l'inhibition du récepteur mannose macrophagique diminue l'activité arginase et la croissance de *T. cruzi* (Garrido *et al.* 2011). Une poursuite de la caractérisation des récepteurs et des voies de signalisation impliqués pourrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes impliqués. La kinésine pourrait faire l'objet de travaux pour une approche vaccinale, car sa neutralisation diminue fortement la croissance du parasite au cours de l'infection.

Ces travaux permettent d'envisager une meilleure compréhension des phénomènes immunopathologiques rencontrés, dans la perspective de thérapeutiques ciblées et d'une approche vaccinale.

Bibliographie

5 Bibliographie

Acosta-Serrano A, Vassella E, Liniger M, Kunz Renggli C, Brun R, Roditi I, Englund PT. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 1513-8.

Al-Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2910-2914.

Albarrag AM, Anderson MJ, Howard SJ, Robson GD, Warn PA, Sanglard D, Denning DW. Interrogation of related clinical pan-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains: G138C, Y431C, and G434C single nucleotide polymorphisms in *cyp51A*, upregulation of *cyp51A*, and integration and activation of transposon *Atf1* in the *cyp51A* promoter. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 5113-21.

Alirol E, Schrupf D, Amici Heradi J, Riedel A, de Patoul C et al. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Medecins Sans Frontieres experience in the Democratic Republic of the Congo. *Clin Infect Dis* 2013; 56: 195-203.

Alsford S, Turner DJ, Obado SO, Sanchez-Flores A, Glover L, Berriman M, Hertz-Fowler C, Horn D. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Research* 2011; 21: 915-24.

Amiguet-Vercher A, Pérez-Morga D, Pays A, Poelvoorde P, Van Xong H, Tebabi P, Vanhamme L, Pays E. Loss of the mono-allelic control of the VSG expression sites during the development of *Trypanosoma brucei* in the bloodstream. *Mol. Microbiol.* 2004; 51: 1577-1588.

Amin DN, Vodnala SK, Masocha W, Sun B, Kristensson K, Rottenberg ME. Distinct Toll-like receptor signals regulate cerebral parasite load and interferon α/β and tumor necrosis factor α -dependent T-cell infiltration in the brains of *Trypanosoma brucei*-infected mice. *J Infect Dis*. 2012 205; 2: 320-32.

Andrade-Neto VV, de Matos-Guedes HL, de Oliveira Gomes DC, do Canto-Cavalheiro MM, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 2012. 107: 416-419.

Autissier P, Soulas C, Burdo TH, Williams KC. Evaluation of a 12-color flow cytometry panel to study lymphocyte, monocyte, and dendritic cell subsets in humans. *Cytometry A*, 2010; 77: 410-9.

Bacchi CJ, Nathan HC, Hutner SH, McCann PP, Sjoerdsma A. Polyamine metabolism: a potential therapeutic target in trypanosomes. *Science* 1980; 210: 332-334.

Bahia MT, Nascimento AF, Mazzeti AL, Marques LF, Goncalves KR et al. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58: 4362-4370.

Balasegaram M, Young H, Chappuis F, Priotto G, Raguenaud ME, Checchi F. Effectiveness of melarsoprol and eflornithine as first-line regimens for gambiense sleeping sickness in nine Medecins Sans Frontières programmes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2009; 103: 280-290.

Banchereau J, Steinman J. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252.

Barrett-Bee K, Ryder N. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition in *Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy*, J. Sutcliffe and N. H. Georgopapadakou, Eds., pp. 410-436, Chapman & Hall, New York, NY, USA, 1992.

Barrett MP, McLeod A, Tovar J, Sweetman JP, Tait A, Le Page RW, Melville SE. A single locus minisatellite sequence which distinguishes between *Trypanosoma brucei* isolates. *Mol Biochem Parasitol* 1997; 86: 95-9.

Bastin P, Sherwin T, Gull K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature* 1998; 391: 548.

Berberof M, Pérez-Morga D, Pays E. A receptor-like flagellar pocket glycoprotein specific to *Trypanosoma brucei gambiense*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2001; 113: 127-138.

Bergson H. L'évolution créatrice. 1907. Collection Quadrige, PUF.

Bergstrom JD, Dufresne C, Bills GF, Nallin-Omstead M, Byrne K. Discovery, biosynthesis, and mechanism of action of the zaragozic acids: potent inhibitors of squalene synthase. *Annual Review of Microbiology* 1995; 49: 607-639.

Berthier D, Brenière SF, Bras-Gonçalves R, Lemesre JL, Jamonneau V, Solano P, Lejon V, Thévenon S, Bucheton B. Tolerance to Trypanosomatids: A Threat, or a Key for Disease Elimination? *Trends Parasitol.* 2016; 32: 157-68.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F, Brooks K, Carrington M, Cherevach I, Chillingworth TJ, Churcher C, Clark LN, Corton CH, Cronin A, Davies RM, Doggett J, Djikeng A, Feldblyum T, Field MC, Fraser A, Goodhead I, Hance Z, Harper D, Harris BR, Hauser H, Hostetler J, Ivens A, Jagels K, Johnson D, Johnson J, Jones K, Kerhornou AX, Koo H, Larke N, Landfear S, Larkin C, Leech V, Line A, Lord A, Macleod A, Mooney PJ, Moule S, Martin DM, Morgan GW, Mungall K, Norbertczak H, Ormond D, Pai G, Peacock CS, Peterson J, Quail MA, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Reitter C, Salzberg SL, Sanders M, Schobel S, Sharp S, Simmonds M, Simpson AJ, Tallon L, Turner CM, Tait A, Tivey AR, Van Aken S, Walker D, Wanless D, Wang S, White B, White O, Whitehead S, Woodward J, Wortman J, Adams MD, Embley TM, Gull K, Ullu E, Barry JD, Fairlamb AH, Opperdoes F, Barrell BG, Donelson JE, Hall N, Fraser CM, Melville SE, El-Sayed NM. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science.* 2005; 309: 416-22.

Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchan T, *et al.* Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49: 892-899.

Biteau N, Bringaud F, Gibson W, Truc P, Baltz T. Characterization of Trypanozoon isolates using a repeated coding sequence and microsatellites markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 105: 185-201.

Black SJ, Guirnalda P, Frenkel D, Haynes C, Bockstal V. Induction and regulation of *Trypanosoma brucei* VSG-specific antibody response. *Parasitology* 2010; 14: 2041-2049.

Blisnick T, Buisson J, Absalon S, Marie A, Cayet N, Bastin P. The intraflagellar transport dynein complex of trypanosomes is made of a heterodimer of dynein heavy chains and of light and intermediate chains of distinct functions. *Mol Biol Cell.* 2014; 25: 2620-33.

Bonhivers M, Nowacki S, Landrein N, Robinson DR. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytotic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol.* 2008; 6:e 105.doi: 10.1371.

Borst P. Antigenic variation and allelic exclusion. *Cell* 2002; 109: 5-8.

Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, Mansuy D. N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 1614-21.

Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* 2008; 27: 6434-6451.

Braga MV, Urbina JA, de Souza W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24: 72-78.

Bringaud F, Biran M, Millerioux Y, Wagnies M, Allmann S, Mazet M. Combining reverse genetics and nuclear magnetic resonance-based metabolomics unravels trypanosome-specific metabolic pathways *Molecular Microbiology* 2015; 96: 917-926.

Bromidge T, Gibson W, Hudson K, Dukes P, Identification of *Trypanosoma brucei gambiense* by PCR amplification of variant surface glycoprotein genes. *Acta Trop (Basel)* 1993; 53: 107-19.

Brown M, Wittwer C. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin Chem* 2000; 46: 1221-9.

Buckner F, Yokoyama K, Lockman J, Aikenhead K, Ohkanda J, Sadilek M, Sebti S, Van Voorhis W, Hamilton A, Gelb MH. A class of sterol 14-demethylase inhibitors as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100: 15149-53.

Burri C, Nkunku S, Merolle A, Smith T, Blum J, Brun R. Efficacy of new, concise schedule for melarsoprol in treatment of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei gambiense* a randomised trial. *Lancet* 2000; 355: 1419-1425.

Burri C. Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology* 2010; 137: 1987-1994.

Bustos-Morán E, Blas-Rus N, Martín-Cófreces NB, Sánchez-Madrid F. Orchestrating lymphocyte polarity in cognate Immune Cell-Cell Interactions. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016; 327: 195-261.

Cachon M, Cosson MP. Ciliary and flagellar apparatuses and their associated structures. *Biol Cell* 1988; 63: 115.

Caljon G, Van Reet N, De Trez C, Vermeersch M, Pérez-Morga D, Van Den Abbeele J. The Dermis as a Delivery Site of *Trypanosoma brucei* for tsetse flies. PLoS Pathog. 2016; 12: e 1005744. doi: 10.1371.

Cammerer SB, Jiménez-Jiménez C, Jones S, et al. Quinuclidine derivatives as potential antiparasitics. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007; 51: 4049-4061.

Cameron P *et al.* Inhibition of lipopolysaccharide induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine proteases and the NFκB signaling pathway. J. Immunol. 2004 173; 3297-3304.

Campos MA *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. J. Immunol. 2001; 167: 416-423.

Campos MA *et al.* Impaired production of proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. J. Immunol. 2004 172: 1711-1718.

Cama E, Colleluori DM *et al.* Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal. Biochemistry 2003; 42: 8445-51.

Capewell P *et al.* The TgsGP gene is essential for resistance to human serum in *Trypanosoma brucei gambiense*. PLoS Pathog. 2013; 9: e 1003686.

Capewell P, Cren-Travaillé C, Marchesi F, Johnston P, Clucas C, Benson RA, Gorman TA, Calvo-Alvarez E, Crouzols A, Jouvion G, Jamonneau V, Weir W, Stevenson ML, O'Neill K, Cooper A, Swar NK, Bucheton B, Ngoyi DM, Garside P, Rotureau B, MacLeod A. The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes. Elife 2016; 5: doi: 10.7554.

Chappuis F, Udayraj N, Stietenroth K, Meussen A, Bovier PA. Eflornithine is safer than melarsoprol for the treatment of second-stage *Trypanosoma brucei gambiense* human African trypanosomiasis. Clin Infect Dis 2005; 41: 748-751.

Chen CK, Leung SS, Guilbert C, Jacobson MP, McKerrow JH, *et al.* Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. PLoS Negl Trop Dis 2010; 4: e 651.

Cherkesova TS, Hargrove TY, Vanrell MC, Ges I, Usanov SA, *et al.* Sequence variation in CYP51A from the Y strain of *Trypanosoma cruzi* alters its sensitivity to inhibition. Febs Letters 2014; 588: 3878-3885.

Coller SP, Mansfield JM, Paulnock DM. Glycosylinositolphosphate soluble variant surface glycoprotein inhibits IFN-gamma-induced nitric oxide production via reduction in stat1 phosphorylation in African trypanosomiasis. *Journal of immunology* 2003; 171: 1466-1472.

Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ. Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6753-6757.

Cox JD, Kim NN, Traish AM, Christianson DW. Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 1043-7.

Dagenais TR, Freeman BE, Demick KP, Paulnock DM, Mansfield JM. Processing and presentation of variant surface glycoprotein molecules to T cells in African trypanosomiasis. *J. Immunol.* 2009; 183: 3344-3355.

Dahl C, Biemann HP, Dahl J. A protein kinase antigenically related to pp60v-src possibly involved in yeast cell cycle control: positive in vivo regulation by sterol. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987; 84: 4012-4016.

Dejesus E, Kieft R, Albright B, Stephens NA, Hajduk S. L. A single amino acid substitution in the group 1 *Trypanosoma brucei gambiense* haptoglobin-haemoglobin receptor abolishes TLF-1 binding. *PLoS Pathog.* 2013; e 1003317.

De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol.* 2005 26; 3: 289-307.

De Koning HP, Jarvis SM. Uptake of pentamidine in *Trypanosoma brucei brucei* is mediated by the P2 adenosine transporter and at least one novel, unrelated transporter. *Acta Trop.* 2001; 80: 245-250.

De Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against *Leishmania amazonensis*. *PLoS One* 2013; 8: e 83247.

De Muylder G, Daulouède S, Lecordier L, Uzureau P, Morias Y, Van Den Abbeele J, Caljon G, Hérin M, Holzmüller P, Semballa S, Courtois P, Vanhamme L, Stijlemans B, De Baetselier P, Barrett MP, Barlow JL, McKenzie AN, Barron L, Wynn TA, Beschin A, Vincendeau P, Pays E. A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e 1003731.

Denny PW, Field MC, Smith DF. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *Febs letters* 2001; 491: 148-53.

De Souza WD, Rodrigues JCF. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2009; 2009: 1-19.

Devine DV, Falk RJ, Balber AE. Restriction of the alternative pathway of human complement by intact *Trypanosoma brucei sub sp. gambiense*. *Infect Immun.* 1986; 52: 223-9.

D'Hondt J, Van Meirvenne N, Moens L, Kondo M. Ca^{2+} is essential cofactor of trypanocidal activity of normal human serum. *Nature* 1979; 282: 613-615.

Donovan MJ, Tripathi V, Favila MA, Geraci NS, Lange MC, Ballhorn W, McDowell MA. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells. *Parasite Immunol.* 2012; 34: 464-72.

Drain J, Bishop JR, Hajduk SL. Haptoglobin-related protein mediates trypanosome lytic factor binding to trypanosomes. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 30254-30260.

Drennan MB, Stijlemans B, Van Den Abbeele J, et al. The induction of a type 1 immune response following a *Trypanosoma brucei* infection is MyD88-dependent. *J Immunol* 2005; 175: 2501-2509.

Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouède S, Boucher JL, Wilson KT, Veyret B, Gobert AP. Mouse Strain Susceptibility to Trypanosome Infection: An Arginase-Dependent Effect. *J Immunol.* 2004; 172: 6298-303.

Dutton JE. Note on a *Trypanosoma* occurring in the blood of man. *British Medical Journal* 1902; 2177: 881-884.

Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 157-185.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey EA, Hertz-Fowler C, Ghedin E, Peacock C, Bartholomeu DC, Haas BJ, Tran AN, Wortman JR, Alsmark UC, Angiuoli S, Anupama A, Badger J, Bringaud F, Cadag E, Carlton JM, Cerqueira GC, Creasy T, Delcher AL, Djikeng A, Embley TM, Hauser C, Ivens AC, Kummerfeld SK, Pereira-Leal JB, Nilsson D, Peterson J, Salzberg SL, Shallom J, Silva JC, Sundaram J, Westenberger S, White O, Melville SE, Donelson JE, Andersson B, Stuart KD, Hall N. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005; 309: 404-409.

Field MC, Carrington M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 775-786.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.

Flandin JF, Chano F, Descoteaux A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36: 411-420.

Forde RM. The discovery of the human *Trypanosoma*. *British Medical Journal,* 1902; 2187: 1741.

Garrido VV, Dulgerian LR, Stempin CC, Cerbán FM. The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. *Int J Biol Sci.* 2011; 7: 1257-72.

Garzón E, Holzmüller P, Bras-Gonçalves R, Vincendeau P, Cuny G, Lemesre JL, Geiger A. The *Trypanosoma brucei gambiense* secretome impairs Lipopolysaccharide-induced maturation, cytokine production, and allostimulatory capacity of dendritic cells *Infection and Immunity* 2013; 8: 3300-3308.

Gay NJ, Symmons MF, Gangloff M, Bryant CE. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* 2014 14; 546-58.

Gazzinelli RT, Denkers EY. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol.* 2006 6; 12: 895-906.

Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. C-type lectin receptors in the control of T helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2016 16; 7: 433-48.

Geiger A, Hirtz C, Bécue T, Bellard E, Centeno C, Gargani D, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB. Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiology.* 2010; 10: 20.

Gibson WC. Will the real *Trypanosoma gambiense* please stand up. *Parasitol Today* 1986; 2: 255-7.

Gibson W, Nemetschke L, Ndung'u J. Conserved sequence of the TgsGP gene in Group 1 *Trypanosoma brucei gambiense*. *Infect. Genet. Evol.* 2010; 10: 453-458.

Giroud C, Ottonnes F, Coustou V, Dacheux D, Biteau N, Miezan B, Van Reet N, Carrington M, Doua F, Baltz T. Murine Models for *Trypanosoma brucei gambiense* disease progression-from silent to chronic infections and early brain tropism. PLoS Negl Trop Dis. 2009 1; 3:e 509.

Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, Davis MM, Shaw AS, Allen PM, Dustin ML. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science 1999; 285: 221.

Gros V, Castillo-Acosta M, Jiménez CJ *et al.* New azasterols against *Trypanosoma brucei*: role of 24-sterol methyltransferase in inhibitor action. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2006; 50: 2595-2601.

Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. Infect Immun. 2000; 68: 4653-7.

Goldstein JL, DeBose-Boyd RA, Brown MS. Protein sensors for membrane sterols. Cell. 2006; 124: 35-46.

Grébaut P, Chuchana P, Brizard JP, Demettre E, Seveno M, Bossard G, Jouin P, Vincendeau P, Bengaly Z, Boulangé A, Cuny G, Holzmuller P. Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity. Int. J. Parasitol. 2009; 39: 1137-1150.

Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Fioretti MC, Puccetti P. Tryptophan catabolism in nonobese diabetic mice. Adv Exp Med Biol. 2003; 527: 47-54.

Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S. Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. J Immunol. 1982; 128: 2779-87.

Guilliams M, Oldenhove G, Noel W, Hérin M, Brys L, Loi P, Flamand V, Moser M, De Baetselier P, Beschin A. African Trypanosomiasis: Naturally Occurring Regulatory T Cells Favor Trypanotolerance by Limiting Pathology Associated with Sustained Type 1 Inflammation J Immunol 2007; 179: 2748-2757.

Gull, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. Annu Rev Microbiol. 1999; 53: 629-655.

Hager KM, Hajduk SL. Mechanism of resistance of African trypanosomes to cytotoxic human HDL. *Nature* 1997; 385: 823-826.

Hall JPJ, Wang H, Barry JD. Mosaic VSGs and the Scale of *Trypanosoma brucei* Antigenic Variation. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003502.

Hamadien M, Lycke N, Bakhiet M. Induction of the trypanosome lymphocyte-triggering factor (TLTF) and neutralizing antibodies to the TLTF in experimental african trypanosomiasis. *Immunology.* 1999; 96: 606-11.

Hamadien M, Bakhiet M, Harris RA. Interferon-gamma induces secretion of trypanosome lymphocyte triggering factor via tyrosine protein kinases. *Parasitology.* 2000; 120: 281-7.

Hammarton TC. Cell cycle regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 153: 1-8.

Hammarton TC, Monnerat S, Mottram JC. Cytokinesis in trypanosomatids *Current Opinion in Microbiology* 2007; 10: 520-527.

Hargrove TY, Wawrzak Z, Alexander PW, Chaplin JH, Keenan M, Charman SA, Perez CJ, Waterman MR, Chatelain E, Lepesheva GI. Complexes of *Trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease: structural basis for pathogen selectivity. *J Biol Chem.* 2013; 288: 31602-31615.

Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90: 3245-3287.

Haubrich BA, Singha UK, Miller MB, Nes CR, Anyatonwu H, Lecordier L, Patkar P, Leaver DJ, Villalta F, Vanhollebeke B, Chaudhuri M, Nes WD, Discovery of an ergosterol-signaling factor that regulates *Trypanosoma brucei* growth. *Journal of Lipid Research* 2015; 56: 331-341.

Hawking F. The differentiation of *Trypanosoma rhodesiense* from *T. brucei* by means of human serum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1973; 67: 517-527.

Hayashida K, Kajino K, Hachaambwa L, Namangala B, Sugimoto C. Direct Blood Dry LAMP: A Rapid, Stable, and Easy Diagnostic Tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9:e 0003578.

Heath WR, Belz GT, Behrens GM, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev.* 2004; 199: 9-26.

Hertz-Fowler C. *et al.* Telomeric expression sites are highly conserved in *Trypanosoma brucei*. *Plos One* 2008; 3: e 3527.

Hide G, Cattand P, LeRay D, Barry JD, Tait A. The identification of *Trypanosoma brucei* subspecies using repetitive DNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 39: 213-25.

Hoare CA. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Blackwell Scientific Publications, Oxford, Edinburgh, 1972.

Holzmuller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Goncalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* 2008; 10: 79-86.

Horn D, Barry JD. The central roles of telomeres and subtelomeres in antigenic variation in African trypanosomes. *Chromosome Res.* 2005; 13: 525-533.

Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, *et al.* Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15: 1068-1076.

Ilboudo H, Jamonneau V, Koffi M, Kaboré J, Amoussa R, Holzmuller P, Garcia A, Bucheton B, Courtin D. Trypanosome-induced Interferon- γ production in whole blood stimulation assays is associated with latent *Trypanosoma brucei gambiense* infections. *Microbes Infect.* 2016; 18: 436-40.

Ishida K, Rodrigues JCF, Ribeiro MD *et al.* Growth inhibition and ultrastructural alterations induced by $\Delta 24(25)$ -sterol methyltransferase inhibitors in *Candida* spp. isolates, including non-albicans organisms. *BMC Microbiology* 2009; 9: 74.

Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J, Kaba D, Koffi M, Solano P, Garcia A, Courtin D, Laveissière C, Lingue K, Büscher P, Bucheton B. Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e 1691. doi: 10.1371.

Jiménez-Jiménez C, Carrero-Lérida J, Sealey-Cardona M, Ruiz-Pérez LM, Urbina JA, Gonzalez-Pacanowska D. $\Delta 24(25)$ -sterol methenyltransferase: intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2008; 160: 52-59.

Jones DC, Foth BJ, Urbaniak MD, Patterson S, Ong HB, et al. Genomic and Proteomic Studies on the Mode of Action of Oxaboroles against the African Trypanosome. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e 0004299.

Kanmogne GD, Stevens JR, Asonganyi T, Gibson WC, Genetic heterogeneity in the *Trypanosoma brucei gambiense* genome analysed by random amplification of polymorphic DNA. *Parasitol Res* 1996; 82: 535-41.

Kapsenberg ML. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 2003; 3: 984-993.

Kato CD, Matovu E, Mugasa CM, Nanteza A, Alibu VP. The role of cytokines in the pathogenesis and staging of *Trypanosoma brucei rhodesiense* sleeping sickness. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2016; 12: 4.

Khan ME, Borde C, Rocha EP, Mériaux V, Maréchal V, Escoll P, Goyard S, Cavaillon JM, Manoury B, Doyen N. TLR9 activation is triggered by the excess of stimulatory versus inhibitory motifs present in *Trypanosomatidae* DNA. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 8; 11: e 3308.

Kieft R, Capewell P, Turner CMR, Veitchb NJ, MacLeodb A, Hajduka S. Mechanism of *Trypanosoma brucei gambiense* (group 1) resistance to human trypanosome lytic factor. *PNAS* 2010; 107: 16137-16141.

Kirrstetter M, Lerin-Lozano C, Heintz H, Manegold C, Gross WL, Lamprecht P. Trypanosomiasis in a woman from Cameroon mimicking systemic lupus erythematosus. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2004; 129: 1315-1317.

Krishnegowda G, Hajjar AM, Zhu J, Douglass EJ, Uematsu S, Akira S, Woods AS, Gowda DC. Induction of proinflammatory responses in macrophages by the glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium falciparum*: cell signaling receptors, glycosylphosphatidylinositol (GPI) structural requirement, and regulation of GPI activity. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 8606-8616.

Lacount DJ, Bruse S, Hill KL, Donelson JE. Double-stranded RNA interference in *Trypanosoma brucei* using head-to-head promoters. *Mol Biochem Parasitol.* 2000; 111: 67-76.

Langousis G, Hill KL. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. Nat Rev Microbiol. 2014; 12: 505-18.

Lazardi K, Urbina JA, de Souza W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1990; 34: 2097-2105.

Lecointre G & Le Guyader H. La classification phylogénétique du vivant. Belin, Paris, 2006.

Lefèvre L, Lugo-Villarino G, Meunier E, Valentin A, Olganier D, Authier H, Duval C, Dardenne C, Bernad J, Lemesre JL, Auwerx J, Neyrolles O, Pipy B, Coste A. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. Immunity. 2013 23; 38: 1038-49.

Lepesheva GI, Nes WD, Zhou W, Hill GC, Waterman MR. CYP51 from *Trypanosoma brucei* is obtusifoliol-specific. Biochemistry. 2004; 43: 10789-10799.

Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, Hill GC, Villalta F, Waterman MR. Sterol 14alpha-demethylase as a potential target for antitrypanosomal therapy: enzyme inhibition and parasite cell growth. Chem Biol. 2007; 14: 1283-1293.

Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14alpha-demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. Biochim Biophys Acta 2007; 1770: 467-477.

Lepesheva GI, Park HW, Hargrove TY, Vanhollebeke B, Wawrzak Z, *et al.* Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14alpha-demethylase and implications for selective treatment of human infections. J Biol Chem 2010; 285: 1773-1780.

Lepesheva GI, Waterman MR Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis. Curr Top Med Chem 2011; 11: 2060-2071.

Lepesheva GI, Hargrove TY, Rachakonda G, Wawrzak Z, Pomel S, Cojean S, Nde PN, Nes WD, Locuson CW, Calcutt MW, Waterman MR, Daniels JS, Loiseau PM, Villalta F. VFV as a New Effective CYP51 structure-derived drug candidate for Chagas disease and visceral leishmaniasis. The Journal of Infectious Diseases 2015; 212: 1439-48.

Li X, Brown N, Chau AS, Lopez-Ribot JL, Ruesga MT, *et al.* Changes in susceptibility to posaconazole in clinical isolates of *Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 2004; 53: 74-80.

Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK. Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. J Clin Invest. 2011; 121: 2736-49

Liechtenstein T, Dufait I, Bricogne C, Lanna A, Pen J, Breckpot K, Escors D. PD-L1/PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T cell Activation and a T cell Differentiation Signal. J Clin Cell Immunol. 2012; 30: S12.

Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology 1999; 104: 81–91.

Lonsdale-Eccles JD, Grab DJ. Trypanosome hydrolase and the blood-brain barrier. Trends Parasitol. 2002; 18: 17-19.

Lorente SO, Gomez R, Jiménez-Jiménez C *et al.* Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. Bioorganic and Medicinal Chemistry 2005; 13: 3519-3529.

Ma CS, Wong N, Rao G, Nguyen A, Avery DT, Payne K, Torpy J, O'Young P, Deenick E, Bustamante J, Puel A, Okada S, Kobayashi M, Martinez-Barricarte R, Elliott M, Sebnem Kilic S, El Baghdadi J, Minegishi Y, Bousfiha A, Robertson N, Hambleton S, Arkwright PD, French M, Blincoe AK, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Fulcher DA, Cook MC, Stepensky P, Boztug K, Beier R, Ikincioğullari A, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Boisson-Dupuis S, Phan TG, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Uzel G, Casanova JL, Tangye SG. Unique and shared signaling pathways cooperate to regulate the differentiation of human CD4+ T cells into distinct effector subsets. J Exp Med. 2016; 213: 1589-608.

Magaraci F, Jiménez CJ, Rodrigues C *et al.* Azasterols as inhibitors of sterol 24-methyltransferase in *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*. Journal of Medicinal Chemistry 2003; 46: 4714-4727.

Magez S, Stijlemans B, Radwanska M, Pays E, Ferguson MA, de Baetselier P. The glycosyl-inositol-phosphate and dimyristoylglycerol moieties of the glycosylphosphatidylinositol anchor of the trypanosome variant-specific surface glycoprotein are distinct macrophage-activating factors. Journal of immunology 1998; 160: 1949-1956.

Magez S, Radwanska M, Beschin A, Sekikawa K, De Baetselier P. Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect. Immun.* 1999; 67: 3128-3132.

Magez S, Radwanska M, Drennan M, *et al.* Interferon-gamma and nitric oxide in collaboration with antibodies are key protective host immune factors during trypanosome Tc13 infections. *J Infect Dis* 2006; 193: 1575-1583.

Malvy D, Chappuis F. Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 986-995.

Mann PA, Parmegiani RM, Wei SQ, Mendrick CA, Li X, *et al.* Mutations in *Aspergillus fumigatus* resulting in reduced susceptibility to posaconazole appear to be restricted to a single amino acid in the cytochrome P450 14alpha-demethylase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 577-581.

Marcello L, Barry JD. Analysis of the VSG gene silent archive in *Trypanosoma brucei* reveals that mosaic gene expression is prominent in antigenic variation and is favored by archive substructure. *Genome Res.* 2007; 17: 1344-1352.

Mariño K, Güther ML, Wernimont AK, Amani M, Hui R, Ferguson MA. Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of *Trypanosoma brucei* UDP-glucose pyrophosphorylase. *Glycobiology.* 2010; 20: 1619-30.

Matthews KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 283-290.

Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 762-74.

McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G *et al.* Targeting Ergosterol biosynthesis in *Leishmania donovani*: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9: e 0003588.

McKean PG. Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 2003; 6: 600-607.

McGettrick AF, Corcoran SE, Barry PJ, McFarland J, Crès C, Curtis AM, Franklin E, Corr SC, Mok KH, Cummins EP, Taylor CT, O'Neill LA, Nolan DP. *Trypanosoma brucei* metabolite indolepyruvate decreases HIF-1 α and glycolysis in macrophages as a mechanism of innate immune evasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016; 113: E7778-E7787.

McGregor P, Szöör B, Savill NJ, Matthews KR Trypanosomal immune evasion, chronicity and transmission: an elegant balancing act. *Nature reviews Microbiology* 2012; 10: 431-438

Michelle C, Nten A, Sommerer N, Rofidal V, Hirtz C, Rossignol M, Cuny G, Peltier JB, Geiger A. Excreted/secreted proteins from trypanosome procyclic strains; *J of biomedicine and biotechnology*. 2010; ID212817.

Millington OR, Di Lorenzo C, Phillips RS, Garside P, Brewer JM. Suppression of adaptive immunity to heterologous antigens during *Plasmodium* infection through hemozoin-induced failure of dendritic cell function. *J. Biol.* 2006 5:5.

Mitropoulos KA, Gibbons GF, Reeves BE. Lanosterol 14 α -demethylase. Similarity of the enzyme system from yeast and rat liver. *Steroids* 1976; 6: 821-829.

Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D et al. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 150-155.

Molina-Portela MP, Samanovic M, Raper J. Distinct roles of apolipoprotein components within the trypanosome lytic factor complex revealed in a novel transgenic mouse model. *J. Exp. Med.* 2008; 205: 1721-1728.

Montalvetti A, Fernandez A, Sanders JM, et al. Farnesyl pyrophosphate synthase is an essential enzyme in *Trypanosoma brucei*. *In vitro* RNA interference and *in vivo* inhibition studies. *J Biol Chem* 2003; 278: 17075-83.

Morrison LJ, Marcello L, McCulloch R. Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell. Microbiol.* 2009; 11: 1724-1734.

Mosmann TR, Bond MW, Coffman RL, Ohara J, Paul WE. T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83: 5654-8.

Mosmann TR, Yokota T, Kastelein R, Zurawski SM, Arai N, Takebe Y. Species specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). *J Immunol.* 1987; 138: 1813-6.

Motyka SA, Englund PT. RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7: 362-368.

Mumba Ngoyi D, Lejon V, Pyana P *et al.* How to shorten patient follow-up after treatment for *Trypanosoma brucei gambiense* sleeping sickness. *J Infect Dis* 2010; 201: 453-463.

Munder M. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *British Journal of Pharmacology* 2009; 158: 638-651.

Namangala B, Brys L, Magez S *et al.* *Trypanosoma brucei brucei* infection impairs MHC Class II antigen presentation capacity of macrophages. *Parasite Immunol* 2000; 22: 361-370.

Namangala B, Sugimoto C & Inoue N. Effects of exogenous transforming factor b on *Trypanosoma congolense* infection in mice. *Infect Immun* 2007; 75: 1878-1885.

Namangala B, De Baetselier P, Beschin A. Quantitative differences in immune responses in mouse strains that differ in their susceptibility to *Trypanosoma brucei brucei* infection. *J Vet Med* 2009; 71: 951-956.

Namangala B. How the African trypanosomes evade host immune killing *Parasite Immunology* 2011; 33: 430-437.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*. 1990; 2: 279-289.

Navarro M, Gull KA. pol I transcriptional body associated with VSG mono-allelic expression in *Trypanosoma brucei*. *Nature* 2001; 414: 759-763.

Navarro M, Penate X, Landeira D. Nuclear architecture underlying gene expression in *Trypanosoma brucei*. *Trends Microbiol.* 2007; 15: 263-270.

Nes WR, McKean ML. *Biochemistry of Steroids and Other Isoprenoids*. University Park Press; Baltimore 1977.

Nes CR, Singha UK, Liu J, Ganapathy K, Villalta F, Waterman MR, Lepesheva GI, Chaudhuri M, Nes WD. Novel sterol metabolic network of *Trypanosoma brucei* procyclic and bloodstream forms *Biochem J.* 2012; 443: 267-277.

Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 14687-92.

Niemann M, Wiese S, Mani J, Chanfon A, Jackson C, Meisinger C, Warscheid B, Schneider A. Mitochondrial outer membrane proteome of *Trypanosoma brucei* reveals novel factors required to maintain mitochondrial morphology. *Mol Cell Proteomics.* 2013; 12: 515-28. doi: 10.1074.

Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. PLoS Negl Trop Dis. 2008; 6:e 147.

Nzoumbou-Boko R, Dethoua M, Gabriel F, Buguet A, Cespuglio R, Courtois P, Daulouède S, Bouteille B, Ngampo S, Mpandzou G, Semballa S, Vincendeau P. Serum Arginase, a Biomarker of Treatment Efficacy in Human African Trypanosomiasis Journal of Clinical Microbiology 2013; 51: 2379-2381.

Okenu DMN, Opara KN, Nwuba RI, Nwagwu M. Purification and characterisation of an extracellular released protease of *Trypanosoma brucei*. Parasitol. Res. 1999; 85: 424-428.

Okomo-Assoumou MC, Daulouede S, Lemesre JL, N'Zila-Mouanda A, Vincendeau P. Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis. Am J Trop Med Hyg. 1995; 53 : 539-43.

Ortiz de Montellano PR, Correia MA. Inhibition of cytochrome P450 enzymes. In: Ortiz de Montellano, PR., editor. Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry. Plenum Publishing Corp; New York: 1995; 3: 305-364.

Osorio EY, Travi BL, da Cruz AM, Saldarriaga OA, Medina AA, Melby PC. Growth factor and Th2 cytokine signaling pathways converge at STAT6 to promote arginase expression in progressive experimental visceral leishmaniasis. PLoS Pathog. 2014 10; 6: e 1004165.

Pauleau AL, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS, Murray PJ. Enhancer mediated control of macrophage-specific arginase I expression. J Immunol. 2004; 172: 7565-73.

Pays E, Vanhollebeke B, Uzureau P, Lecordier L, Pérez-Morga D. The molecular arms race between African trypanosomes and humans Nature reviews Microbiology 2014; 12: 575-584.

Parks LW, Casey WM. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. Annu Rev Microbiol. 1995; 49: 95-116.

Paulnock DM, Freeman BE, Mansfield J. Modulation of innate immunity by African trypanosomes. Parasitology. 2010; 137: 2051-2063.

Pérez-Morga D. et al. Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. Science 2005; 309: 469-472.

Perdomo D, Bonhivers M, Robinson DR. The trypanosome flagellar pocket collar and its ring forming protein-TbBILBO1. *Cells* 2016; 5: 9. doi: 10.3390.

Pletinckx K, Stijlemans B, Pavlovic V, Laube R, Brandl C, Kneitz S, Beschin A, De Baetselier P, Lutz MB. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or *Trypanosoma brucei* antigens instruct default Th2-cell responses. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41: 3479-3494.

Pomel S, Cojean S, Loiseau PM. Targeting sterol metabolism for the development of antileishmanials. *Trends in Parasitology* 2015; 31: 5-7.

Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, et al. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 2009; 374: 56-64.

Puhr S, Lee J, Zvezdova E, Zhou YJ, Liu K. Dendritic cell development-History, advances, and open questions. *Seminars in Immunology* 2015; 27: 388-396.

Radwanska M. et al. The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67: 684-690.

Radwanska M. et al. Novel primer sequences for a polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2002; 67: 289-295.

Ramakrishnan S, Serricchio M, Striepen B, Bütikofer P. Lipid synthesis in protozoan parasites: A comparison between kinetoplastids and apicomplexans. *Progress in Lipid Research* 2013; 52: 488-512.

Recktenwald D.J. Introduction to flow cytometry: principles, fluorochromes, instrument set-up, calibration. *J Hematother* 1993; 2: 387-94.

Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 476-83.

Rivière L, Moreau P, Allmann S, Hahn M, Biran M, Plazolles N, Franconi J-M, Boshart M, Bringaud F. Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic cell trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 2009; 106: 12694-12699.

Roberts CW, McLeodm R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126: 129-142.

Robinson DR, Gull K. Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* 1991; 352: 731-3.

Rodrigues JCF, Attias M, Rodriguez C, Urbina JA, de Souza W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22,26-azasterol, a $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46: 487-499.

Rodrigues JCF, Concepcion JL, Rodrigues C, Caldera A, Urbina JA, de Souza W. *In vitro* activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2008; 52: 4098-4114.

Rodrigues JFC, Urbina JA, de Souza W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology* 2005; 111: 230-238.

Rodrigues MM, Oliveira AC, Bellio M. The Immune Response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-Like Receptors and Perspectives for Vaccine Development. *J Parasitol Res.* 2012 2012: 507874.

Rohmer M, Bouvier P, Ourisson G. Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979; 76: 847-851.

Rudenko G. African trypanosomes: the genome and adaptations for immune evasion. *Essays Biochem.* 2011; 51: 47-62.

Sacks DL, Askonas BA. Trypanosome induced suppression of anti-parasite responses during experimental African trypanosomiasis. *Eur J Immunol* 1980; 10: 971-974.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and down-regulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994; 179: 1109-18.

Salmon D. et al. Adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* inhibit the innate immune response of the host. *Science* 2012; 337: 463-466.

Sanglard D. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5: 379-85.

Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage nature immunology 2012; 13: 1145-1154.

Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S *et al.* Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 2123-2129.

Serricchio M, Schmid AW, Steinmann ME, Sigel E, Rauch M, Julkowska D, Bonnefoy S, Fort C, Bastin P, Bütikofer P. Flagellar membranes are rich in raft-forming phospholipids *Biology Open* 2015; 4: 1143-1153.

Sher A, Tosh K, Jankovic D. Innate recognition of *Toxoplasma gondii* in humans involves a mechanism distinct from that utilized by rodents. *Semin Immunol.* 2015; 27: 388-96.

Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Fèvre EM, Mattioli RC, Jannin JG Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e 1859.

Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 1987; 41: 363-82.

Sinha P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 1137-42.

Smith TK, Butikofer P. Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 2010; 172: 66-79.

Soeiro M, de Souza EM, da Silva CF, Batista Dda G, Batista MM, Pavão BP, Araújo JS, Aiub CA, da Silva PB, Lionel J, Britto C, Kim K, Sulikowski G, Hargrove TY, Waterman MR, Lepesheva GI. *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 4151-63.

Springer AL, Bruhn DF, Kinzel KW, Rosenthal NF, Zukas R, Klingbeil MM. Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immobility in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 2011; 175: 68-75.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 1973; 137: 1142-1162.

Stijlemans B, Baral TN, Guilliams M et al. A glycosylphosphatidylinositol-based treatment alleviates trypanosomiasis-associated immunopathology. *J Immunol* 2007; 179: 4003-4014.

Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTOR-Mediated Regulation of Dendritic Cell Differentiation and Function. *Trends Immunol.* 2016; Sep 7: doi: 10.1016.

Szempruch AJ, Sykes SE, Kieft R, Dennison L, Becker AC, Gartrell A, Martin WJ, Nakayasu ES, Almeida IC, Hajduk SL, Harrington JM. Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia. *Cell* 2016; 164: 246-57.

Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, et al. Fexinidazole -a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4: e 923.

Trzaskos JM, Bowen WD, Shafiee A, Fischer RT, Gaylor JL. Cytochrome P-450-dependent oxidation of lanosterol in cholesterol biosynthesis. Microsomal electron transport and C-32 demethylation. *J. Biol. Chem* 1984; 259: 13402-13412.

Tyler KM, Fridberg A, Toriello KM, et al. Flagellar membrane localization via association with lipid rafts. *J Cell Sci* 2009; 122: 859-66.

Urbina JA, Vivas J, Lazardi K, et al. Antiproliferative effects of $\Delta 24(25)$ sterol methyl transferase inhibitors on *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Chemotherapy* 1996; 42: 294-307.

Urbina JA, Visbal G, Contreras LM, McLaughlin G, Docampo R. Inhibitors of $\Delta 24(25)$ sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 1428-1432.

Urbina JA, Concepcion JL, Rangel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania Mexicana*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 2002; 125: 35-45.

Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A et al. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 2379-2387.

Uzureau P. et al. Mechanism of *Trypanosoma gambiense* resistance to human serum. *Nature* 2013; 501: 430-434.

Vanhamme L. et al. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature* 2003; 422: 83-87.

Vanhollebeke B. et al. Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104: 4118-4123.

Vanhollebeke B. et al. A haptoglobin-haemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. *Science* 2008; 320: 677-681.

Vannier-Santos MA, Urbina JA, Martiny A, Neves A, de Souza W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 1995; 42: 337-346.

Vickerman K, Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. *Br. Med. Bull.* 1985; 41: 105-114.

Vincendeau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD. Arginases in parasitic diseases. *Trends Parasitol.* 2003; 1: 9-12.

Visbal G, Alvarez A, Moreno B, San-Blas G. Sadenosyl- L-methionine inhibitors $\Delta 24$ -sterol methyltransferase and $\Delta 24(28)$ -sterol methylreductase as possible agents against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47: 2966-2970.

Vivas J, Urbina JA, de Souza W. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by $\Delta 24(25)$ sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *International Journal of Antimicrobial Agents* 1996; 7: 235-240.

Voorheis HP. Fatty acid uptake by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and other species of the kinetoplastida. *Mol Biochem Parasitol.* 1980; 1: 177-186.

Volkman JK. Sterols and other triterpenoids: source specificity and evolution of biosynthetic pathways. *Org Geochem.* 2005; 36: 139-159.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B. Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 253-6.

Vuitton DA, Gottstein B. *Echinococcus multilocularis* and its intermediate host: a model of parasite-host interplay. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010: 923193.

Waldbauer JR, Newman DK, Summons RE. Microaerobic steroid biosynthesis and the molecular fossil record of Archean life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011; 108: 13409-13414.

Wang Z, Morris JC, Drew ME, Englund PT. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. *J Biol Chem.* 2000; 275: 40174-9.

Wei G, Tabel H. Regulatory T cells prevent control of experimental African trypanosomiasis. *J Immunol* 2008; 180: 2514-2521.

Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 99: 89-101.

Woodward R, Gull K, Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 1990; 95: 49-57.

Xiao L, Madison V, Chau AS, Loebenberg D, Palermo RE, McNicholas PM. Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14 α -sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 568-74.

Xong HV. *et al.* A VSG expression site-associated gene confers resistance to human serum in *Trypanosoma rhodesiense*. *Cell* 1998; 95: 839-846.

Xu W, Hsu FF, Baykal E, Huang J, Zhang K Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in *Leishmania*. *PLoS Pathog* 2014; 10: e 1004427.

Yoshida Y, Aoyama Y. Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation. I. Purification and spectral properties. *J. Biol. Chem* 1984; 259: 1655-1660.

Zabaleta J, McGee DJ, Zea AH, Hernández CP, Rodríguez PC, Sierra RA, Correa P, Ochoa AC. *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol.* 2004; 173: 586-93.

Zelante T, De Luca A, D'Angelo C, Moretti S, Romani L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol.* 2009; 39: 645-8.

Zeng H, Cohen S, Guy C, Shrestha S, Neale G, Brown SA, Cloer C, Kishton RJ, Gao X, Youngblood B, Do M, Li MO, Locasale JW, Rathmell JC, Chi H. mTORC1 and mTORC2 Kinase Signaling and Glucose Metabolism Drive Follicular Helper T Cell Differentiation. *Immunity*. 2016; 45: 540-54.

Zhou W, Cross GA, Nes WD. Cholesterol import fails to prevent catalyst-based inhibition of ergosterol synthesis and cell proliferation of *Trypanosoma brucei*. *J Lipid Res*. 2007; 48: 665-673.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4T cell populations. *Annu. Rev. Immunol*. 2010; 28: 445-489.

Annexe

A *Trypanosoma* kinesin promotes parasite growth by triggering host arginase activity

Romarc Nzoumbou-Boko¹, Géraldine De Muylder², Laurence Lecordier², Frédéric-Antoine Dauchy¹, Philippe Holzmüller³, Jean-Loup Lemesre⁴, Rachel Bras-Gonçalves⁴, Sylvie Daulouède¹, Pierrette Courtois¹, Alain Beschin², Etienne Pays², Philippe Vincendeau¹

¹ UMR InterTryp 177 IRD/CIRAD/University of Bordeaux, Laboratoire de Parasitologie, F-33000 Bordeaux, France.

² Laboratory of Molecular Parasitology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

³ UMR CIRAD-INRA Contrôle des maladies animales exotiques et émergentes F-34398 Montpellier, France

⁴ Institut de Recherche pour le Développement, UMR177 IRD/CIRAD "INTERTRYP", Montpellier, France

ABSTRACT

African trypanosomes can efficiently undermine the protective immune response of their hosts to favor their survival within the host and successful transmission by its vector. Excreted /secreted factors are among the first parasite molecules involved in the establishment of an environment favoring parasite settlement. We report here that factors released by the parasite promote the degradation of L-arginine through increase of arginase activity in macrophages/myeloid cells, and antagonize NO synthases (NOS)-mediated conversion of L-arginine into NO in infected mice. Arginase induction appears to attenuate the innate response at the early stage of infection, and likely contributes to the synthesis of polyamines and the trypanosome anti-oxidant trypanothione, known to promote trypanosome growth and colonization of the host. During acute infection, a *Trypanosoma brucei* protein named Kinesin Heavy Chain 1 (TbKHC1) is released and sustains the development of the first (most prominent) peak of parasitaemia. TbKHC1 is found to interact with SIGN-R1 at the surface of immune cells. TbKHC1 modulates arginine/NO metabolism via an IL-10-dependent induction of arginase 1 and down-regulation of iNOS activities. Consequently, IL-10/arginase 1 producing cells are impaired in their capacity to destroy the parasite, favoring parasite settlement. A kinesin modulating host arginine/NO metabolism is also detected in *T. muscui*, a natural murine parasite. Its neutralization during infection decreased parasite load. *T. muscui* kinesin showed high similarity with TbKHC1, and bioinformatics analysis revealed the presence of this gene in other trypanosomes. Thus, targeting TbKHC1 may benefit the host protective immunity against *T. brucei*.

MATERIALS AND METHODS

Trypanosoma brucei brucei ANtAT 1.1E (EATRO1125)

T. muscui, (Partinico II, London School of Hygiene and Tropical Medicine)

Parasite released factors (PRF) (Holzmüller, 2008)

Macrophage cultures and cocultures with trypanosomes, measurements of Arginase activity and nitrites (Duleu, 2004)

cDNA expression library screening, TbKHC1 KD and KO parasites, rTbKHC1, IF assay, (De Muylder, 2013)

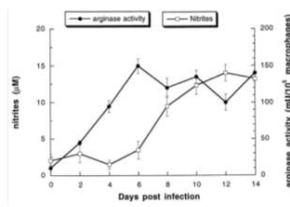
INTRODUCTION

Macrophages (M ϕ) play a key role in trypanosomiasis. Classically activated M ϕ , with immune components (antibodies, complement, cells), are associated with parasite killing whereas alternatively activated M ϕ decrease it. In alternatively activated M ϕ , arginase induction leads to a depletion of L-arginine (substrate of iNOS, resulting in lower levels of cytotoxic NO) and increased production of polyamines (necessary for parasite growth and differentiation).

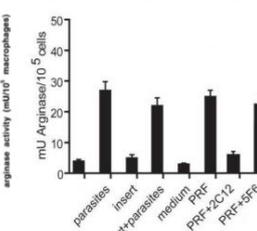
In mice infected by *T. muscui*, a natural murine parasite, arginase induction by was investigated. M ϕ Arginase expression is induced by glycosylated HMW parasite soluble factors (PRF). A mAb directed to a member of trypanosome kinesin family specifically inhibits parasite-induced arginase expression. Mannose inhibits parasite-induced arginase expression. Injection of mannose into infected mice reduce parasitemias.

RESULTS

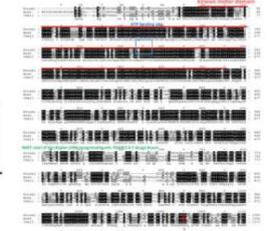
Early arginase induction in *T. brucei* trypanosomiasis



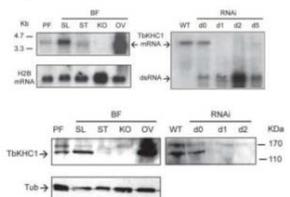
Arginase induction is mediated by PRF. and was inhibited by a monoclonal Ab



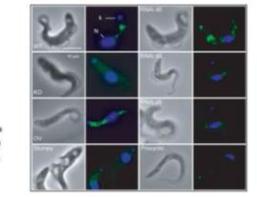
A Kinesin Heavy Chain isoform identified by screening a cDNA library with this mAb



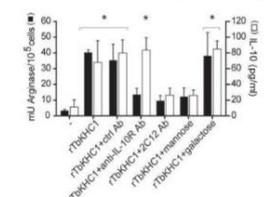
Expression of TbKHC1



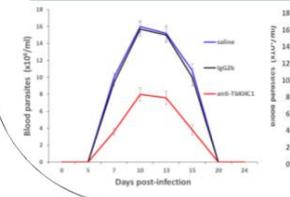
TbKHC1 partially localizes in the endocytic compartment



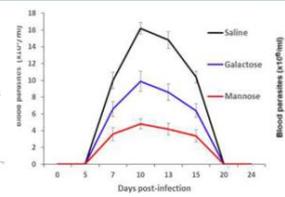
IL-10 and mannose regulate TbKHC1-induced arginase activity



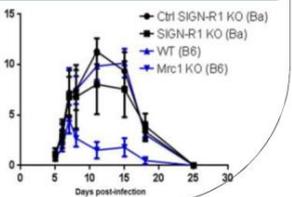
T. muscui infection in the presence of anti-TbKHC1



T. muscui infection in the presence of mannose and galactose



T. muscui infection in MMR KO, SIGN-R1 KO, B6, control (Ctrl) mice



CONCLUSION

A kinesin heavy chain released by trypanosomes induces IL-10 and arginase-1 through mannose receptor signaling in myeloid cells, which promotes early trypanosome growth and favors parasite settlement in the host. Bioinformatics analysis revealed the presence of this gene in trypanosomes. Targeting this kinesin may benefit the host protective immunity against these parasites.

REFERENCES

- De Muylder G *et al.* A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *PLoS Pathog.* 2013 Oct;9(10):e1003731. doi: 10.1371/journal.ppat.1003731.
- Holzmüller P *et al.* Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei gambiense* field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* 2008, 10:79-86.
- Duleu S *et al.* Mouse strain susceptibility to trypanosome infection, an arginase-dependent effect. *J Immunol.* 2004, 172:6298-303.
- Nzoumbou-Boko R *et al.* *Trypanosoma muscui* infection in mice critically relies on mannose receptor-mediated arginase induction by a TbKHC1 homologue (submitted)

Immunopathologie et approche thérapeutique dans la trypanosomose africaine

Résumé

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil est une infection provoquée par un protozoaire du genre *Trypanosoma*. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est nécessaire afin d'améliorer l'efficacité et la tolérance des traitements.

Dans un premier travail, nous avons étudié l'importance de CYP51 (stérol 14 α -déméthylase), une cible potentielle, par la technique d'interférence à ARN (RNAi). Nous avons démontré le caractère essentiel de cette enzyme pour le parasite, ainsi que les conséquences de sa déplétion sur la cytodièrese. De plus, la survie de souris infectées par la souche CYP51^{RNAi} induite était prolongée, montrant l'implication de CYP51 dans la virulence. La combinaison du posaconazole, un dérivé triazolé inhibant CYP51, à l'éflornithine a montré un effet similaire à la combinaison nifurtimox-éflornithine dans un modèle murin. Nos résultats soulignent l'intérêt potentiel d'un traitement ciblant CYP51 dans la trypanosomose.

Du fait de l'importance de l'immunodépression dans la THA et de la capacité du trypanosome à échapper au système immunitaire de l'hôte, nous avons étudié, dans un deuxième travail, l'effet de *T. gambiense* et de son sécrétome (protéines excrétées/sécrétées) sur des cellules dendritiques humaines (DCs) *in vitro*. Nous avons ainsi montré une altération de la maturation des DCs induite par le LPS en présence du sécrétome. Nous avons également montré qu'une des protéines de ce sécrétome, *TbKHC1*, est exprimée par différentes espèces de trypanosomes. Elle est impliquée dans l'induction de l'arginase macrophagique chez la souris, un mécanisme d'échappement au système immunitaire. Ces travaux apportent des éléments pour une meilleure compréhension des phénomènes immunopathologiques rencontrés, dans la perspective de thérapeutiques ciblées et d'une approche vaccinale.

Mots clés : *Trypanosoma brucei*, CYP51, immunité innée

Abstract

Trypanosoma brucei gambiense, an extracellular eukaryotic flagellate parasite, is the main causative agent of Human African Trypanosomiasis (HAT), also known as sleeping sickness. Trypanosomes have developed efficient mechanisms to escape the host immune response. New therapeutic options are needed for patients with HAT.

Sterol 14 α -demethylase (CYP51) is a potential drug target but its essentiality has not been studied in *T. brucei*. In a first study, we demonstrated its essentiality by RNA interference (CYP51^{RNAi}) *in vitro*. CYP51^{RNAi} induction caused morphological defects with multiflagellated cells, suggesting cytokinesis dysfunction. Additionally, the survival of CYP51^{RNAi} infected-mice was improved, showing CYP51 RNAi effect on trypanosomal virulence. During infection with virulent strains, posaconazole-eflornithine and nifurtimox-eflornithine combinations showed similar improvement in mice survival. Thus, our results provide support for a CYP51 targeting based treatment in HAT.

In a second work, we studied the innate host immune system characteristics in trypanosomiasis, as a severe immune dysregulation is present in HAT. To analyse the potential immunomodulatory activity of *T. gambiense* in human settings, we assess the effect of its secretome on dendritic cells (DCs) *in vitro*, using human monocyte-derived DCs. A significant inhibition of the LPS-induced maturation of DCs was observed with secretome. In line with this impairment, secretome down regulated cytokines production by LPS-activated DCs. *TbKHC1*, a kinesin heavy chain, is a component of the parasite secretome. We confirmed its role in parasitic escape to immune system by inducing arginase activity, in a murine model. Our results provide new information about the immune system characteristics during trypanosomiasis, which may help to uncover new therapeutic approaches in HAT.

Key words: *Trypanosoma brucei*, CYP51, innate immunity