



HAL
open science

Étude des phospholipases du trypanosome africain

Sarah Monic

► **To cite this version:**

Sarah Monic. Étude des phospholipases du trypanosome africain. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0079 . tel-03269976

HAL Id: tel-03269976

<https://theses.hal.science/tel-03269976>

Submitted on 24 Jun 2021

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.

Thèse présentée pour obtenir le grade de

**DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Microbiologie - Immunologie

Par **Sarah Gaëlle Monic**

Étude des phospholipases du trypanosome africain

Sous la direction de : **Dr. Loïc Rivière**

Membres du jury :

Pr. Lilly Maneta-Peyret, Professeur, Présidente (Université de Bordeaux)

Dr. Anne Geiger, CR- IRD, Rapporteuse (IRD Cameroun)

Dr. Sébastien Besteiro, CR1- CNRS, Rapporteur (Université de Montpellier)

Dr. Sébastien Mongrand, DR-CNRS, Examineur (Université de Bordeaux)

Dr. Loïc Rivière, MCU, Directeur de thèse, membre invité (Université de Bordeaux)

Soutenue le 19 mars 2021 à Bordeaux

Résumé

Trypanosoma brucei brucei est un parasite unicellulaire sanguicole de l'ordre des Kinétoplastidés responsable d'une maladie que l'on nomme trypanosomiase africaine ou maladie du sommeil chez les humains. Ce parasite peut également contaminer des animaux, ils seront alors atteints de la Nagana. La particularité de ce parasite est qu'il met en jeu un vecteur de transmission, la glossine. Ce vecteur transmet le parasite à l'hôte par piqûre contaminante, lors de la prise d'un repas de sang. Ce trypanosome possède donc un cycle évolutif très particulier qui malgré sa complexité, menace de contamination des millions d'individus en Afrique.

Dans les travaux que nous avons effectués, nous nous intéressons plus particulièrement aux phospholipases présentes dans ce parasite.

En effet, les lipides sont des constituants essentiels des membranes des cellules et des ressources importantes pour le métabolisme du parasite. D'anciennes études ont montré que les parasites les plus virulents, qui entraînent une symptomatologie plus bruyante sur les hôtes, possèdent une activité Phospholipase A1(PLA1) très importante. D'autant plus les parasites qui peuvent se retrouver dans d'autres compartiments que les vaisseaux sanguins comme *Trypanosoma brucei*.

Une analyse *in silico* nous a permis de mettre en évidence différents gènes pouvant coder pour des enzymes à activité lipase et de les étudier de manière plus approfondie. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux protéines pouvant avoir une activité PLA1. Nous avons nommé ces gènes d'intérêt TbPLA1b, TbPLA1c et TbbLa. Plusieurs études de localisations ont été menées afin de déterminer où se trouvent les protéines dans les cellules. Nous avons trouvé que pour le premier candidat TbPLA1b, la localisation était double, à la fois dans le cytosol et dans des organites particuliers : les glycosomes. Les localisations des deux autres candidats PLA1 n'ont pas pu être déterminées avec exactitude.

Concernant la fonction de ces protéines, il semblerait que l'activité de TbPLA1b, soit à la fois une activité PLA1 et une activité lysophospholipase. TbPLA1c pourrait avoir une activité PLA2 ce qui ferait d'elle la première jamais décrite chez ces parasites. Quant à TbbLa nous n'avons pas encore pu déterminer son activité.

L'une des questions centrales de ce travail était d'étudier la redondance des différentes lipases dans le parasite afin de comprendre comment elles s'organisent dans la cellule pour effectuer leur rôle d'hydrolyse. En effet, aucune d'entre elle n'est essentielle dans les conditions de culture et il semblerait donc que les activités se chevauchent, permettant au parasite de palier à ses besoins énergétiques malgré les gènes manquants.

De manière intéressante, il semble y avoir un lien entre l'expression de TbPLA1c et de TbPLA1b, ce qui pourrait se comprendre par l'activité PLA2 de la première et lysophospholipase de la seconde. Leur action combinée permet de libérer les deux acides gras des glycérophospholipides.

Nous sommes encore au début de nos travaux sur ces lipases, étant donné leur diversité et leur nombre, et il sera important de continuer les investigations pour savoir dans quelle mesure elles prennent part à la fois au métabolisme et à la virulence du parasite.

Mots clefs : *Trypanosoma brucei*, phospholipase, formes sanguines, lipides, PLA1

**Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité - UMR5234
146, Rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex (France)**

Abstract

Trypanosoma brucei brucei is a single-cell parasite, part of the Kinetoplastidae order. It causes a disease known as African trypanosomiasis or sleeping sickness in humans. This parasite can also infect animals, they will then be affected by Nagana. This parasite involves a transmission vector, glossina. This vector transmits the parasite to the host through a contaminating bite during a blood meal. The trypanosome has a very particular evolutionary cycle which, despite its complexity, threatens the contamination of millions of individuals in Africa.

In our work, we are more particularly interested in the phospholipases of this parasite. Indeed, lipids are essential constituents of cell membranes and important resources for the metabolism of the parasite. Previous studies have shown that the more virulent parasites, which cause severe symptoms in hosts, have very high Phospholipase A1 (PLA1) activity. This is especially true for parasites which can be found in compartments other than blood vessels such as *Trypanosoma brucei*.

An *in silico* analysis allowed us to highlight different genes that can code for enzymes with lipase activity. We are more particularly interested in proteins which can have a PLA1 activity. We named these genes of interest TbPLA1b, TbPLA1c and TbbLa. Several localization studies have been carried out to determine where proteins are found in cells. We found that for the first candidate TbPLA1b, there was a dual location, both in the cytosol and in a particular organelle, the glycosomes. The locations of the other two PLA1 candidates could not be determined with accuracy.

Regarding the function of these proteins, it appears that TbPLA1b has both PLA1 activity and lysophospholipase activity. TbPLA1c may have PLA2 activity making it first protein of this type ever described in these parasites. For TbbLa, we have not yet been able to determine its activity.

One of the central questions of this work was to study the redundancy of different lipases in the parasite in order to understand how they organize themselves in the cell to perform their hydrolytic role. Indeed, none of them are essential under normal *in vitro* growing conditions and it seems that the activities overlap, allowing the parasite to meet its energy needs despite the missing genes.

Interestingly, there seems to be a link between the expression of TbPLA1c and TbPLA1b, which could make sense at the light of the PLA2 activity of the first and lysophospholipase of the second. They can generate two fatty acids from glycerophospholipids.

We are still at the beginning of our work on these lipases and it will be important to continue the investigations to know their place in both the metabolism and the virulence of the parasite.

Keywords: *Trypanosoma brucei*, phospholipase, bloodstream forms, lipids, PLA1, PLA2

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. J'espère avoir laissé transparaître tout l'intérêt que je porte au trypanosome et à l'évolution en général.

Merci au Pr. Lilly Maneta-Peyret, au Dr. Anne Geiger, au Dr. Sébastien Besteiro et au Dr. Sébastien Mongrand pour leur temps et leur présence, physique ou zoomique.

Merci à mon Directeur de thèse, le Dr. Loïc Rivière pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans son équipe, sur un sujet très intéressant bien que vaste, qui amènera je l'espère à la réalisation de bien d'autres thèses par la suite. Merci de m'avoir accompagné sur la voie de l'enseignement.

Merci à L'ARS d'avoir permis le financement de cette thèse et à la SSIF pour son soutien constant. Je tiens aussi à remercier le Pr. Hirtz et le Pr. Deville de Périère pour leur soutien à Montpellier et leur encouragement pour finir le manuscrit de thèse.

Fred, le James Bond du labo, merci pour votre soutien et votre gentillesse. Merci pour le temps que vous prenez pour aider chacun de nous à interpréter nos résultats obscurs.

Merci à Geneviève et Sandrine, l'équipe administrative du MFP qui m'a toujours soutenue avec le statut trop à part d'interne en pharmacie et toujours aidée avec gentillesse et bienveillance.

Merci à l'équipe du cytosquelette pour leur gentillesse, leurs conseils et leurs plasmides, plus particulièrement à N2co pour avoir toujours répondu présent quand l'ordi était cassé et pour Imageux-Jie. Merci Denis, pour tes encouragements et ton enthousiasme. Merci Karine, pour les rigolades, les supers bonnes idées et les cellules de prépuce.

Merci à l'équipe de Myco et plus particulièrement à N1co pour son aide et à Thierry pour les cours de dessin dans le couloir.

Mag, tu as été ma première formatrice au labo et je tiens à te montrer ma reconnaissance pour ce que tu m'as appris, la rigueur avec laquelle tu l'as fait et pour ton assistance constante. Et aussi pour tes références Kaamelott.

Merci à Maïté pour les fous rires Kuzco, Kaamelott, Apex et les remix de chansons.

Mon N3co, merci de toujours trouver d'où vient le problème, merci d'avoir créé ton émission « Nico les bons tuyaux » et de nous aider tous, avec une efficacité redoutable, à chaque instant, dans la bonne humeur et la joie.

Ma Coco, merci d'avoir toujours pris soin de moi quand j'avais des coups de mou, merci d'avoir été notre maman du bureau, d'avoir su rire avec nous même si on était un peu neuneus.

Merci à mes deux frères et ma sœur de Master 2, Riri Magamba et Cyndia, Roi, Empereur et j'en passe, vous me manquez déjà. Je suis heureuse que nous ayons pu faire la thèse ensemble, rdv à Bordeaux dans quelques années au labo d'Ori.

Ori et Simone, je laisse une trace ici pour la postérité mais ce n'est rien à côté de celle que vous laissez dans ma vie, vous êtes des membres de ma famille, on vous aime et mes parents ont les papiers d'adoption.

Merci à Anne pour le partage de galère et les rigolades, pour l'énergie que tu mets dans chaque chose.

Merci Quente pour tout ce dont on ne peut pas parler ici et pour ta folie constante qui m'inspire.

Merci à Chloé, Julie, Juju, Rodolpho, Stefy et Pauline, j'aurais aimé passer plus de temps avec vous !

Merci à Sidi, l'infiltré, pour ta gentillesse et toutes les fois où tu étais le seul à comprendre mes références et ne me laissais pas rire seule.

Merci Erika, pour ton aide et ton sourire permanent, tu es un rayon de soleil.

Merci Christine pour ta joie de vivre sans faille et communicative et pour toutes les fois où tu réponds présente quand on a besoin de toi.

Merci à mon Manu, tu es l'image que je me fais du savant avec ce quelque chose qui donne envie de tout tenter, l'humour en plus. Merci de m'avoir intégré à la SSIF et de m'avoir toujours soutenue au niveau scientifique et le reste. On aura franchement bien rigolé.

Merci à ma Karine et ma Jacqueline, mes sorcières préférées. Je sais que les liens que l'on a construits ne disparaîtront pas. Merci de m'avoir relevé, plus que n'importe qui dans toutes les galères de ces dernières années. Merci d'avoir pu compter sur vous, vous êtes des anges dans ce labo.

Merci à mes copains de St Andrews, Xupeng, Janie, Fernanda, Aleksei, mais surtout Simon et Leigh-Ann.

Merci à *Trypanosoma brucei brucei* de m'avoir permis de rencontrer toutes ces personnes extraordinaires.

Merci à ma sœur et ma nièce qui sont les personnes les plus importantes de ma vie.

Merci à mon amoureux qui m'a suivi jusqu'à Montpellier et me soutient chaque jour.

Merci à mon petit papa et ma petite maman de m'aider à gérer ma vie et de m'aimer malgré moi depuis toujours, vous êtes les plus belles personnes de ce monde.

LISTE DES ABREVIATIONS

AID : Activation- induced cytidine deaminase	IL : Interleukine	PTS1/2 : Peroxisome targeting signal 1/ 2
APOA-1 / APOL-1 : Apolipoprotéine A ou L	IP3 : Inositol-3-Phosphate	RAG : Recombination activating gene
AQP2 : Aquaporine 2	IPC : Inositol phosphorylcéramide	RE : Reticulum endoplasmique
AT1 : Adénosine Transporter 1	ISG : Invariant Surface Glycoprotein	RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
BHE : Barrière Hémato Encéphalique	IV : Intraveineux	S1P1 : Sphingosine-1-P
C-ter : Domaine C-terminal	kD : kiloDalton	SEP : Sclérose en plaque
CATT : Card Agglutination Test	LCR : Liquide Céphalo-Rachidien	SHM : Somatic Hypermutation / Hypermutation Somatique
CDP-Cho : cytidine-diphosphate Choline	LDL : Low Density Protein	SIF : Stumpy Induction Factor
CIVD : Coagulation Intravasculaire Disséminée	LPC : Lysophosphatidylcholine	SM : Spectrométrie de masse
CL : Cardiolipine	LPL : Lysophospholipides	SM : Sphingomyéline
cPLA2 : PLA2 cytosoliques	LT : Lymphocyte T	SNC : Système Nerveux Central
CXCL10 : C-X-C Motif chemokine 10	MMP : Matrix Metalloproteinases	sPLA2 : PLA2 sécrétées
CYP 450 : Cytochrome P 450	NECT : Nifurtimox- Eflornithine Combination Therapy	SRA : Serum Resistance Associated protein
DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole	NO : Nitric Oxygen	SVF : Sérum veau foetal
DG- DAG : Diacylglycérol	NTD : N-Terminal Domain	TAO : Trypanosome Alternative Oxydase
DL50 : Dose Létale 50%	NTR : Nitroréductase	TbAAT6 : <i>Trypanosoma brucei</i> eflornithine transporter
DMSO : Diméthylsulfoxyde	OMS : Organisation Mondiale de la Santé	TbAT1 : <i>Trypanosoma brucei</i> Adénosine Transporteur 1
DTT : Dithiothréitol	PAD = Proteins Associated with Differentiation	TbbLa : <i>Trypanosoma brucei</i> LipAse
EP et les GPEET : Glutamic acid E and Proline P : GPEET : Procyclins + internal peptide.	PAF : Platelet activating factor	Tbg : <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>
EPC : Ethanolamine phosphorylcéramide	PC : Phosphatidylcholine	TbGRP89 : <i>Trypanosoma brucei</i> G Receptor Protein 89
FFA : Free fatty acid	PCR /LAMP : Polymérase Chain Reaction – Loop mediated isothermal amplification	TbMSP-B : <i>Trypanosoma brucei</i> Major Surface Protease
GIVA-PLA2 : Group IVA cytosolic PLA2	PCV : Packed Cell Volume / Volume des cellules emballées	TbPLA1a : <i>Trypanosoma brucei</i> Phospholipase A1 a
GO : Gene Ontology	PE : Phosphatidylethanolamine	TbPLA1b : <i>Trypanosoma brucei</i> Phospholipase A1 b
GPCho: Glycérophosphatidylcholine	PEX-protéines : Peroxines	TbPLA1c : <i>Trypanosoma brucei</i> Phospholipase A1 c
GPI : Glycosylphosphatidylinositol	PGK-A : Phosphoglycérate Kinase A	Tbr : <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>
GVIA-PLA2 : Group VIA cytosolic PLA2	PKC : Protéine Kinase C	THA : Trypanosomiase Humaine Africaine
HDL : High Density Protein	PL : Phospholipase	TLF : Facteur Trypanolytique
Hp-Hb : Haptoglobine – hémoglobine (récepteur)	PLA1 : Phospholipase A1	TLR9 : Toll Like Receptor 9
HPLC : High Pressure Liquid Chromatography	PLA2 : Phospholipase A2	TNF- α : Tumor Necrosis Factor α
HRP : Haptoglobin Related Protein	PLA2 LpPLA2 : Oxidized lipid lipoprotein associated PLA2	TPI : Triosephosphate Isomérase
HSP60 : Heat Shock Protein 60	PLA2i : PLA2 calcium indépendantes	VEX-1 : VSG-Exclusion-1
IC ₅₀ : Inhibition Concentration 50%	PLB : Phospholipase B	VIH : Virus immunodéficience humaine
ICAM/VCAM : InterCellular Adhesion Molecule / Vascular Cell Adhesion Molecule	PLC : Phospholipase C	VSG : Variant Surface Glycoprotein
IFN γ : Interféron γ	PLD : Phospholipase D	WB : Western Blot
	PS : Phosphatidylsérine	

TABLE DES MATIERES

<i>Chapitre 1 : Introduction</i>	14
1 Introduction au projet de thèse	15
2 Généralités sur la trypanosomiase africaine	16
2.1 L'histoire de la maladie	16
2.1.1 Description clinique de la maladie du sommeil	16
2.1.2 Évolution et découverte de la maladie	21
2.1.3 Description des acteurs de la trypanosomiase africaine	25
2.1.3.1 La glossine	25
2.1.3.2 Le parasite	26
2.1.3.2.1 Généralités	26
2.1.3.2.2 Le VSG	27
2.1.3.2.3 Les glycosomes	30
2.1.3.2.4 Le kinétoplaste	32
2.1.3.2.5 Le cytosquelette : le flagelle et les microtubules	33
2.1.3.2.6 Le sécrétome	33
2.1.3.3 Le cycle du parasite	36
2.1.4 Quelques Trypanosomes chez les animaux	40
2.1.4.1 Trypanosoma vivax	40
2.1.4.2 Trypanosoma congolense	41
2.1.4.3 Trypanosoma equiperdum	42
2.1.4.4 Trypanosoma evansi	42
2.1.4.5 Les animaux trypanotolérants	43
2.2 Les interactions hôtes-parasites	45
2.2.1 Les facteurs de résistance génétiques contre les parasites	45
2.2.1.1 Généralités sur le facteur trypanolytique : TLF	45
2.2.1.2 La résistance au TLF de Trypanosoma brucei rhodesiense	46
2.2.1.3 La résistance au TLF de Trypanosoma brucei gambiense	47
2.2.1.4 Les mutations génétiques favorables	49
2.2.1.5 Les mutations génétiques défavorables	51
2.2.1.6 La coévolution du facteur avec l'hôte	51
2.2.2 Les actions du système immunitaire	52
2.3 Les moyens de lutte	54
2.3.1 Les différentes épidémies	54
2.3.2 Le dépistage de la maladie	55
2.3.3 Les éléments à prendre en compte dans la gestion de la trypanosomiase africaine	57
2.3.4 La prophylaxie	58
2.3.4.1 Les idées d'autrefois	58
2.3.4.2 La prophylaxie actuelle	60
2.3.5 Les traitements existants	61
2.3.5.1 La prise en charge thérapeutique humaine	61
2.3.5.2 Quelques données vétérinaires	62
2.3.6 Les mesures mondiales portées par l'OMS	63
3 Généralités sur les lipides	64
3.1 Qu'est-ce qu'un lipide ?	64
3.2 Qu'est-ce qu'une lipase ?	64
3.2.1 Les α/β hydrolases	65
3.2.2 Les estérases	66
3.2.3 Les lipases	66
3.2.3.1 Le détail du site actif	66
3.2.3.2 Le capot amovible	69
3.2.3.3 Les activités non hydrolitiques : Moonlighting	69

3.2.3.4	Les modifications de site consensus	70
3.2.4	Les Phospholipases	70
3.2.4.1	Classement	70
3.2.4.2	Rôle des phospholipases	71
3.2.4.2.1	Les phospholipases A2 (PLA2)	71
3.2.4.2.2	Les enzymes à domaine patatine	73
3.2.4.2.3	Les phospholipases A1	73
3.3	Les produits de dégradation des phospholipides	74
3.3.1	Les lysophospholipides	75
3.3.1.1	Composition	75
3.3.1.2	Rôle	75
3.3.2	Les acides gras libres	76
3.3.2.1	Composition	76
3.3.2.2	Rôles	76
3.4	Les Lipides dans le trypanosome africain	77
3.5	Les phospholipases dans les trypanosomatides	79
3.5.1	L'activité phospholipase majoritaire	79
3.5.2	Les fonctions supposées	80
3.5.2.1	L'activité au niveau du manteau VSG	81
3.5.2.2	L'acquisition de lipides exogènes	81
3.5.2.3	L'activité hémolytique	81
3.5.3	Les phospholipases A1	84
3.5.4	Les phospholipases A2	85
3.5.5	Les phospholipases C	85
3.6	Projet de thèse	86
	<i>Chapitre 2 : Matériel et méthode</i>	88
1	Culture cellulaire des parasites	89
1.1	Lignées cellulaires utilisées	89
1.1.1	427	89
1.1.2	Antat	89
1.2	Milieux de culture	90
1.3	Congélation parasites	91
1.4	Expérience de sécrétome	91
2	Culture des bactéries	92
2.1	Les lignées	92
2.1.1	Les bactéries pour le clonage	92
2.1.2	Les bactéries pour l'expression hétérologue	92
2.1.2.1	Les BL21 Star de Thermofisher	92
2.1.2.2	Les Rosetta 2 de Novagen	92
2.2	Congélation bactéries	92
3	Les différents extraits de parasites	93
3.1	Préparation d'extraits protéiques pour gels d'électrophorèse	93
3.2	Préparation d'extraits protéiques pour le gel natif	93
3.3	Préparation d'extraits pour expérience d'activité	93
3.4	Préparation d'extraits pour fractionnement à la digitonine	93
3.5	Préparation des extraits pour l'analyse lipidomique	94
4	Extraction et Dosage de l'Adn	94

5	Quantification des protéines	94
6	Utilisation du LAS et WB	94
7	Expression et purification de protéines	95
7.1	Expression de TbPLA1b	95
7.2	Expression de TbPLA1c	95
8	Modification génétique des parasites	96
8.1	Vecteur pLEW100	96
8.2	PCR " Touch down "	96
8.3	Le principe de l'ARN interférence	97
8.4	Clonage	98
8.5	Transformation des bactéries XL1-Blue :	99
9	Transfection des parasites	99
10	Insertion de tag directement au locus d'un gène : tag in situ	99
11	Délétion de gènes par Knock-out (KO)	100
12	Immunofluorescence indirecte	101
13	Perméabilisation des membranes à la digitonine	101
14	Lyse osmotique	102
15	Sécrétion des protéines	102
16	Détection d'activités phospholipase	103
16.1	Utilisation de kits commerciaux	103
16.2	Analyses de lipidomique	103
16.2.1	Analyse globale lipidique des échantillons	103
16.2.2	Analyse de l'activité lipase	104
<i>Chapitre 3 : Résultats et discussions</i>		105
1	TbPLA1b	106
1.1	L'article scientifique	106
1.2	Analyses <i>in silico</i> complémentaires de TbPLA1b	138
1.3	Etudes expérimentales complémentaires.	143
1.3.1	Etude de la croissance de de 427 possédant 3 allèles de TbPLA1b.	143
1.3.2	Répartition de TbPLA1b	144
1.3.3	La lyse hypotonique	144
1.3.4	Fractionnement à la digitonine	147
1.3.5	Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)	148
1.3.6	Analyse par gel natif	149
1.3.7	Possible voie de sécrétion de TbPLA1b	149
1.3.8	Analyses complémentaires de TbPLA1b : conclusion générale	150
1.3.9	Les expériences et les analyses de lipidomique	151
1.3.9.1	La lipidomique globale sur lysat de cellule.	151
1.3.9.2	Les analyses de lysats d'Antat sauvage supplémentés en TbPLA1b	152
1.3.9.2.1	Validation du profil des Antat WT et de la méthodologie	153
1.3.9.2.2	Comparaison des Antat WT avec les Antat KOTbPLA1b	154

1.3.9.2.3	Comparaison des Antat sauvages et des Antat supplémentés en TbPLA1b	155
2	TbPLA1c	157
2.1	Analyses in silico	157
2.1.1	Généralités	157
2.1.2	Recherche d'orthologues et comparaison de séquences.	157
2.1.3	Localisation de TbPLA1c	159
2.1.3.1	Étude de la séquence	159
2.1.3.2	Les méta-analyses et le TrypTag	159
2.1.3.3	L'expression le long du cycle cellulaire	160
2.1.3.4	TbPLA1c dans la littérature	160
2.2	Etudes expérimentales	161
2.2.1	La localisation de la TbPLA1c dans le trypanosome africain	161
2.2.1.1	Réexpression de TbPLA1cTy dans le trypanosome à l'aide du pLew 100	161
2.2.1.2	Endotagging Ty-eYFP-TyTbPLA1c et TbPLA1c10Ty	163
2.2.2	Solubilité de TbPLA1c	165
2.2.3	Création d'anticorps spécifiques	167
2.2.4	Expression de TbPLA1c dans Rosetta 2	168
2.2.5	Études fonctionnelles de TbPLA1c	169
2.2.5.1	Vérification des mutants KOTbPLA1c	169
2.2.5.2	Croissance des KOTbPLA1c en milieu IMDM	170
3	Étude de l'activité phospholipase dans le trypanosome africain.	171
3.1	Etude de la croissance des différents mutants KOTbPLA1b	172
3.2	Activité PLA1 et PLA2 des mutants 427 KOTbPLA1b	174
3.2.1	Activité PLA1	175
3.2.2	Activité PLA2	175
3.3	Analyse des KO des gènes candidats	176
3.3.1	Etude de la croissance des différents mutants en milieu 10% SVF	176
3.3.2	Etude de la croissance dans des milieux aux concentrations différentes en SVF	179
3.3.3	Activité PLA1 des différents mutants	181
3.3.4	Activité PLA2 des différents mutants	182
3.4	Stratégie d'étude de nouvelles combinaisons de mutants de phospholipases	185
3.4.1	Courbe de croissance des KOTbPLA1c et KOTbbLa et de leur ARNi combinés	186
3.4.2	L'activité PLA1 et PLA2 des mutants des KOTbPLA1c et KOTbbLa	188
4	Discussion des résultats	192
4.1	TbPLA1b	192
4.2	TbPLA1c	198
4.3	Réflexion sur la littérature	199
	<i>Chapitre 4 : Conclusion</i>	201

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Double chancre d'inoculation du trypanosome africain ou trypanome	16
Figure 2 : Ganglion de Winterbottom, pathognomonique d'une contamination par le trypanosome africain	17
Figure 3 : Patients atteints de trypanosomiase aux deux stades de la maladie	18
Figure 4 : Arbre de l'évolution de l'ordre des Kinétoplastidés comprenant les parasites du genre Trypanosoma et de la séparation entre les sections Salivaria et Stercoraria.....	22
Figure 5 : Schéma d'une Glossine	25
Figure 6 : Glossina mortisans	25
Figure 7 : Schéma d'un trypanosome forme sanguine	26
Figure 8 : Mécanismes de modification du VSG permettant la variation antigénique.....	28
Figure 9 : Comparaison entre l'hypermutation des Lymphocytes B et la complexité du VSG parasitaire	29
Figure 10 : Classification phylogénétique des trypanosomes africains	32
Figure 11 : Exemple de protéines sécrétées par le trypanosome et leur rôle dans sa survie et dans la physiopathologie.....	34
Figure 12 : Cycle de vie du trypanosome africain.....	37
Figure 13 : Sécrétion du SIF entraînant l'apparition de formes stumpy	38
Figure 14 : Stade parasitaire selon le cycle évolutif du trypanosome africain	39
Figure 15 : Bovins atteints de trypanosomiase animale.....	40
Figure 16 : Mécanisme général de l'endocytose des TLF	46
Figure 17 : Action trypanolytique sur le Trypanosoma brucei brucei et protection du SRA contre la lyse parasitaire	47
Figure 18 : Mécanisme général de la trypanolyse chez l'Homme.....	48
Figure 19 : L'hypo-haptoglobulinémie, facteur protecteur de trypanosomiase à Trypanosoma brucei gambiense	49
Figure 20 : Acquisition de facteurs évolutifs protecteurs contre le Trypanosoma brucei rhodesiense.....	50
Figure 21 : Répartition des glossines vectrices de trypanosomiase humaine et cas déclarés de maladie du sommeil.....	55
Figure 22 : Relation étroite entre l'environnement et l'activité humaine, permettant la compréhension de la complexité de l'éradication de la trypanosomiase africaine	57
Figure 23 : Les habitants d'un village africain, examinés pour être testés et lominidisés.....	59
Figure 24 : Exemple de pièges à glossines.....	60
Figure 25 : Organigramme décisionnel de prise en charge de la maladie du sommeil.....	61
Figure 27 : Répartition des trypanosomes capables de provoquer une trypanosomiase animale chez les hôtes mammifères	63
Figure 28 : Evolution du nombre de cas de maladie du sommeil sur les 20 dernières années.....	63
Figure 29 : Structure canonique des α/β hydrolases.....	65
Figure 31 : Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester	68
Figure 32 : Action des diverses phospholipases sur les fonctions esters des phospholipides.....	71
Figure 33 : Ancienne et nouvelle annotation concernant les Glycérophospholipides les plus répandus.....	74
Figure 34: Formule semi-développée des différents glycérophospholipides pouvant être les substrats des phospholipases	75
Figure 35 : Réaction de synthèse des triglycérides par la triglycéride synthase ou de lyse par une lipase..	77
Figure 36: Répartition des différents types de lipides du trypanosome africain pour les formes procycliques à gauche et sanguines à droite.....	78
Figure 37 : Représentation schématique du plasmide pJ1173	90
Figure 38 : Les antibiotiques présents dans les mutants réalisés	91
Figure 39 : Primers utilisés pour les ARN interférences dans le pLew 100.....	97
Figure 40 : Principe de l'ARN interférence	98
Figure 41 : Représentation schématique du pPotV7 avec 10TyTag.....	100
Figure 42: Primers utilisés pour les expériences d'endotagging ou de KO	100
Figure 43 : Substrat du kit Enzcheck® PLA1	103
Figure 44 : Substrat du kit Enzcheck® PLA2	103
Figure 45 : Stratégie expérimentale de l'étude des phospholipases du trypanosome africain	107
Figure 46 : Alignement des orthologues de la TbPLA1b au niveau du pentapeptide catalytique.....	140
Figure 47 : Comparaison de la structure cristalline des orthologues de la TbPLA1b dans le Pseudomonas aeruginosa et dans l'Homme.....	141
Figure 48 : Evolution de l'expression de TbPLA1b au cours du cycle cellulaire selon le Dr. Tinti	142
Figure 49 : Etude de la croissance des parasites 427 avec surexpression des allèles de TbPLA1b mutés. 143	143

Figure 50 : Lyse hypotonique sur les mutants de surexpression des différentes versions de la TbPLA1b et analyse quantitative de la quantité de TbPLA1a par rapport à la quantité totale de protéine.....	146
Figure 51 : Fractionnement à la digitonine des parasites 427+TyTbPLA1b-SKS.....	147
Figure 52 : Etude par HPLC de la TbPLA1b.....	148
Figure 53 : Gel natif par extraction à la digitonine de parasites Antat sauvages.....	149
Figure 54 : Western blot de la sécrétion de la TbPLA1b dans les différents mutants de la lignée KOTbPLA1b.....	150
Figure 55 : Spectre lipidique des parasites Antat WT	153
Figure 56 : Spectre lipidique des parasites Antat WT supplémentés en PLA2 bovine.....	154
Figure 57: Spectre lipidique des parasites Antat KOTbPLA1b	155
Figure 58: Spectre lipidique des parasites Antat WT supplémentés en TbPLA1b.....	155
Figure 59 : Alignement TbPLA1c de l'Homme, du chien et du trypanosome africain avec le logiciel Geneious.....	158
Figure 60 : Prédiction des différents domaines de TbPLA1c selon TriTrypDB.....	159
Figure 61 : Localisation de TbPLA1c en N-term et en C-term de la protéine d'après le site Tryptag.....	160
Figure 62 : Evolution de la quantité de TbPLA1c le long du cycle cellulaire selon le Dr. Tinti.....	160
Figure 63 : Western Blot de vérification de la présence de TbPLA1cTy	162
Figure 64 : Endotagging TbPLA1c en N-term grâce au pPotV2.....	163
Figure 65 : Endotagging TbPLA1c en C-term grâce au pPotV7.	164
Figure 66 : Expérience de lyse hypotonique avec révélation de la TbPLA1c10Ty à gauche, de l'aldolase et de l'énolase à droite	165
Figure 67 : Évolution de l'expression de la TbPLA1c10Ty en présence de l'ARNiTbPLA1c dans la souche 427.....	166
Figure 68 : Purification de la TbPLA1c grâce au plasmide petSumo.....	168
Figure 69 : PCR de vérification du KOTbPLA1c dans Antat1173.....	169
Figure 70 : Temps de doublement des KOTbPLA1c par rapport aux cellules Antat sauvages.....	170
Figure 71 : Stratégie d'étude des activités phospholipases des mutants à partir du KOTbPLA1b.....	172
Figure 72 : Courbe de croissance en conditions normales et déprivées en sérum des KOTbPLA1b induits et non induits pour l'expression d'ARN interférences sur d'autres candidats à activité PLA1 putative.	173
Figure 73 : Activité PLA1 et PLA2 des extraits parasitaires du KOTbPLA1b et de ses lignées ARNI induites à 16 jours.	174
Figure 74 : Obtention des KO d'intérêt grâce à l'utilisation du pPotV7.....	176
Figure 75 : Courbe de croissance sans antibiotique des Antat KO pour les gènes d'intérêt.....	177
Figure 76 : Courbe de croissance avec antibiotique des Antat KO pour les gènes d'intérêt.....	178
Figure 77 : Courbe de croissance de Trypanosoma brucei brucei en excès de sérum.....	180
Figure 78 : Courbe de croissance de Trypanosoma brucei brucei en défaut de sérum.....	180
Figure 79 : Comparaison de l'activité PLA1 entre les différents mutants cultivés dans des concentrations différentes en sérum.....	182
Figure 80 : Activité PLA2 dans les Antat et les différents KO des gènes d'intérêt.....	183
Figure 81 : Comptage des cellules avant l'expérience qui donna lieu à la figure 80	183
Figure 82 : Densité des parasites au deuxième jour des expériences d'activité PLA2	184
Figure 83 : Activité PLA1 et PLA2 des Antat WT et des KOTbPLA1c.....	184
Figure 84 : Stratégie d'étude des mutants KOTbPLA1c et KOTbbLa avec des combinaisons d'ARNi	185
Figure 85 : Courbe de croissance des mutants KOTbbLa et KOTbPLA1c et leurs ARNi	186
Figure 86 : Courbe de croissance des mutants des KOTbPLAc et KOTbbLa induits après passage à 3% de sérum dans le milieu de culture	187
Figure 87 : Activité PLA1 et PLA2 des mutants KOTbPLA1c et KOTbbLa.....	189

Chapitre 1 : Introduction

1 Introduction au projet de thèse

La trypanosomiase africaine est une pathologie du continent africain qui affecte aussi bien les animaux que les humains. La maladie du sommeil, proprement humaine, est causée par un parasite microscopique du nom de trypanosome. Ce parasite est inoculé lors de la piqûre d'une glossine qui se nourrit et décharge par la même occasion le parasite dans son hôte.

Connue depuis plusieurs millénaires, la trypanosomiase africaine reste cependant un problème majeur et sous-diagnostiqué de la santé des peuples d'Afrique. Cette maladie peut se représenter comme une guerre basée sur fond de « théorie de l'évolution » dans laquelle les protagonistes animaux, Hommes, vecteurs et parasites se livrent depuis des siècles une lutte sans merci.

Dans la première partie de ce travail seront abordés tous les acteurs de la pathologie. Nous y découvrirons en détail le parasite et le vecteur, ainsi que les mesures de lutttes passées et actuelles. Nous y introduirons aussi l'étroite relation entre les espèces et leur évolution concomitante, qui fascine en termes de questionnement de la Nature. Seront présentés ensuite des généralités sur les lipides et les lipases et leurs rôles concernant la physiologie du parasite. Nous parlerons enfin plus particulièrement des phospholipases qui sont au centre de ce sujet d'étude.

A ce jour, peu de recherches ont porté sur les phospholipases bien que leurs fonctions pourraient être au cœur du métabolisme et de la virulence du parasite. Mon travail de thèse a consisté en l'étude de nouveaux gènes du trypanosome africain, pouvant coder pour des protéines à activité phospholipase (PL), par des approches de génomique fonctionnelle et de lipidomique.

2 Généralités sur la trypanosomiase africaine

2.1 L'histoire de la maladie

2.1.1 Description clinique de la maladie du sommeil

La trypanosomiase africaine, maladie vectorielle engendrée par les parasites *Trypanosoma brucei*, de l'ordre des Kinétoplastidés, se décline sous deux formes. Elle peut être humaine et prendra le nom de « Maladie du sommeil », elle sera alors causée par deux parasites, *Trypanosoma brucei gambiense (Tbg)* et *Trypanosoma brucei rhodesiense (Tbr)* ou animale. Lorsque le parasite se développe chez l'animal, on dira qu'il est atteint de « Nagana », ce qui signifie « être déprimé » en zoulou. On comprendra donc que cette affection puisse être nommée différemment selon les lieux de description de la maladie. Ces maladies sont connues du continent Africain depuis des milliers d'années. La pathologie se traduit par l'inoculation du parasite par l'insecte vecteur ou glossine, suivie de deux phases distinctes :

- La piqure de la mouche tsé-tsé est très douloureuse. Les parasites sont inoculés en même temps que la glossine prend son repas de sang et un chancre d'inoculation (Figure 1) apparaît très rapidement. C'est la première action du système immunitaire, qui consiste à confiner le parasite à la zone de piqure. Lors de l'apparition de ce chancre, un érythème local et un œdème se forment. La lésion est sensible et chaude, caractéristique du processus inflammatoire. Elle disparaît en approximativement deux semaines. Les parasites sont retrouvés dans le sang du patient en 5 jours.



Figure 1 : Double chancre d'inoculation du trypanosome africain ou trypanome
Photographie d'après (Hope-Rapp et al. 2009)

- La première phase, lymphatico-sanguine : le parasite a diffusé depuis le point de pique et se retrouve dans le sang et la lymphe pour se multiplier. Des vagues successives de parasitémie induisent des fièvres intermittentes, des adénopathies (ganglions mobiles et douloureux) et une splénomégalie. L'hypertrophie des ganglions lymphatiques de la partie postérieure du cou ou signe de Winterbottom (Figure 2) est pathognomonique de l'infection à *Trypanosoma brucei gambiense* (incidence 56 à 95%) (*Trypanosomiase Humaine Africaine Lutte Et Surveillance*. 2015).



*Figure 2 : Ganglion de Winterbottom, pathognomonique d'une contamination par le trypanosome africain
Photographie du CIRDES*

Cette physiopathologie s'accompagne de malaises et de maux de tête, d'un épuisement extrême, de douleurs musculaires et articulaires, d'un prurit et d'une anémie. Des modifications de l'électrocardiogramme s'observent chez plus de 50% des patients en première phase de la maladie (allongement de l'intervalle Q-Tc). Cette étape est marquée par un profil inflammatoire très important (Figure 3) durant lequel de nombreuses cellules du système immunitaire entrent en jeu, sont recrutées et détruisent le parasite (Vincendeau et Bouteille 2006).

Concernant *Trypanosoma brucei*, une part de la physiopathologie s'explique par l'activation de plasminogène et l'apparition d'anticorps nombreux et successifs qui entrent dans la formation de complexes immuns antigène-anticorps qui se

déposent dans les petits vaisseaux, entraînant leur obstruction, comme dans les reins par exemple. Le système immunitaire s'épuise en luttant de manière permanente contre le parasite qui, ayant la capacité de variation antigénique (cf Le VSG), induit une succession de vagues parasitologiques occupant le système immunitaire de l'hôte, qui se retrouve démuni lors de l'affection concomitante avec d'autres microorganismes (Goodwin 2008).

Certains cas de guérison totale ont été décrits et peuvent survenir si la réponse immune est efficace (Jamonneau et al. 2012). On pourrait alors supposer que certains humains sont devenus trypanotolérants, c'est-à-dire qu'ils supportent une charge parasitaire tout au long de leur vie sans développer de symptômes physiques. Cependant, le plus souvent, il y a une balance entre le contrôle par le système immunitaire et la parasitémie, qui amène à une régulation chronique de cette dernière.



Figure 3 : Patients atteints de trypanosomiase aux deux stades de la maladie

Photographies du Pr. Pierre Aubry et I.M.T.S.S.A Le Pharo (Marseille) : Aspect bouffi de l'enfant au stade précoce de la maladie à gauche. Troubles nerveux du patient adulte, amaigri, en stade terminal de la maladie à droite.

Chaque bouleversement immun, un stress ou l'affection par un autre microorganisme, peut faire pencher la balance et diminuer le contrôle du système immunitaire sur l'invasion parasitaire. Quand le patient ou l'animal ne contrôle

plus la pathologie, la symptomatologie ressemble à un syndrome d'Arthus c'est à dire que le patient devient oedémateux, ses muscles s'amointrissent. Une protéinurie croissante survient et les reins sont un des premiers organes qui dysfonctionnent. Des dépôts de fibrinogène sont observés dans les poumons notamment. Le taux de plasminogène chute radicalement dans les vaisseaux, entraînant des désordres dans la cascade de l'hémostase. Les vaisseaux sont abimés par le processus infectieux et on observe la présence de monocytes, plaquettes et de phagocytes qui se collent à l'endothélium et induisent l'obstruction des vaisseaux. Une lyse continue des parasites mène à terme à la destruction des vaisseaux et il n'est pas rare de retrouver myocardite, encéphalite, cellulite et lymphadénite.

Certains désordres mineurs neurologiques et endocrinologiques peuvent apparaître à ce stade. On observe une irritabilité et des changements de comportement des individus. Les patients perdent l'appétit, ont une sensation de froid et deviennent impotents et infertiles. Pour nuancer ce tableau clinique, certains scientifiques attestent de la présence de troubles du sommeil et de confusion chez les patients en stade précoce (phase 1) de trypanosomiase à *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Ces patients sont cependant très souvent poly-parasités, notamment par les parasites du genre *Plasmodium* (Kato et al. 2015).

- La deuxième phase, méningo-encéphalique (Figure 3) est caractérisée par la présence du parasite dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Des études *in vitro* sur des cellules endothéliales ont montré que le parasite est capable à un certain stade, sous l'action des enzymes du système immunitaire de l'hôte, et du parasite, de passer la barrière hémato-encéphalique (BHE) en modifiant l'intégrité de l'endothélium (P. G. E. Kennedy et Rodgers 2019).

Les signes neurologiques peuvent apparaître lors de la phase lymphatico-sanguine mais le patient entre officiellement, selon l'OMS, dans la seconde phase par la présence d'au moins 5 leucocytes par μL de LCR ou la détection du parasite dans le LCR, ce qui est souvent le cas. Cette définition est controversée, car la présence de 5 leucocytes / mm^3 dans le LCR peut être provoquée par un autre pathogène. Dans l'Afrique de l'ouest, le diagnostic peut être posé à partir de 20 leucocytes/ mm^3 dans le LCR.

Cette seconde étape est insidieuse et peut apparaître progressivement, parfois des années après la contamination. Durant cette période la symptomatologie devient celle qui donna son nom à la maladie. Les patients se mettent à dormir la journée et avoir des insomnies la nuit. La physiopathologie de la 1ere phase s'accroît, notamment la symptomatologie cardiaque, et on observe en plus des désordres psychiques avec des comportements agressifs, des confusions, des troubles de l'humeur et des tremblements (Vincendeau et Bouteille 2006). Il y a à ce stade une inflammation méningée généralisée qui induit la perte des gaines de myélines et la formation d'auto-anticorps réversible après traitement.

L'invasion de l'éminence médiane et des noyaux supra-chiasmatiques ainsi que du thalamus et du striatum expliquent la multiplicité des symptômes décrits. Au niveau endocrinologique, le rythme circadien n'est pas le seul cycle à être perturbé. En effet, il n'est pas rare de rencontrer dans la phase terminale de l'infection des modifications de sécrétion d'hormones telles que le cortisol ou la prolactine, un amaigrissement pourtant accompagné d'une sensation de faim et pour terminer des troubles proches de la démence et des crises d'épilepsie.

Le signe de la clé de Kerandel est caractérisé par une douleur vive au moindre choc et déterminé par des troubles sensitifs profonds et très présents lors de la phase terminale de la maladie. Des mouvements anormaux sont observés ainsi que des tremblements, des difficultés d'élocution et des réflexes archaïques. L'évolution de cette pathologie, sans traitement est fatale la plupart du temps et le patient décède de cachexie ou de désordres physiologiques trop importants.

Il existe une forme atypique de la maladie, présente chez les patients provenant de zones non-endémiques. La symptomatologie se décline plutôt sous forme gastro-intestinale avec essentiellement une diarrhée aiguë, une jaunisse et une très forte fièvre. De même, alors que le chancre d'inoculation n'est que peu présent chez les patients vivants en zone endémique, on le retrouve dans 84% des infections à *Trypanosoma brucei rhodesiense* et dans 47% des infections à *Trypanosoma brucei gambiense* chez le voyageur.

Cette symptomatologie atypique, radicalement différente des symptômes habituellement neurologiques qui entraînent le dépistage de la Maladie du Sommeil, appuie le besoin d'une vigilance accrue auprès des voyageurs revenant de zone

endémique avec un tableau physiopathologique gastro-intestinal (Urech, Neumayr, et Blum 2011).

De manière globale, la succession des événements pour l'Homme est la même que l'on soit porteur du *Trypanosoma brucei gambiense* ou *rhodesiense* mais la durée des symptômes diverge. Pour *Trypanosoma brucei gambiense* la maladie évolue sur environ trois ans alors que pour les porteurs de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, elle peut être fatale en moins de six mois (Franco et al. 2014).

La quantité de trypanosomes sanguins est aussi plus cyclique avec une trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense* tandis que la charge parasitaire est souvent très élevée pour *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Ces généralités doivent cependant être pondérées par les facteurs humains, parasitaires et géographiques. En cela on entend que les populations autochtones vivent avec le parasite depuis bien longtemps et certaines se sont génétiquement adaptées à la présence du parasite. De même la souche de parasite ne sera pas exactement la même, comme on peut l'imaginer, selon l'évolution. On notera comme exemple un stade hémolympatique chronique pour les porteurs de *Trypanosoma brucei rhodesiense* au Malawi (P. G. Kennedy 2013).

2.1.2 Évolution et découverte de la maladie

Bien avant la description précise de la maladie que l'on connaît si bien aujourd'hui, les Hommes ont évolué avec cette pathologie mortelle dont ils ignoraient l'origine et ont dû lutter contre ses vecteurs dont ils soupçonnaient le pouvoir infectant.

Au niveau phylogénétique, le séquençage des gènes de l'ARNr18S des différents trypanosomes a permis de séparer les parasites de la section *Salivaria*, dont ceux responsables de la trypanosomiase africaine, qui se transmettent par piqûre des insectes vecteurs, des autres trypanosomes de la section *Stercoraria*, qui se transmettent par les déjections des insectes vecteurs, il y a environ 300 millions d'années (Figure 4). Cette valeur n'est pas exacte et varie si l'on prend en considération l'évolution des hôtes et des vecteurs, par exemple dans cette étude, l'évolution des oiseaux et l'arrivée de la glossine et de son ancêtre la protoglossine (Haag 1998) (il y a 140 millions d'années).

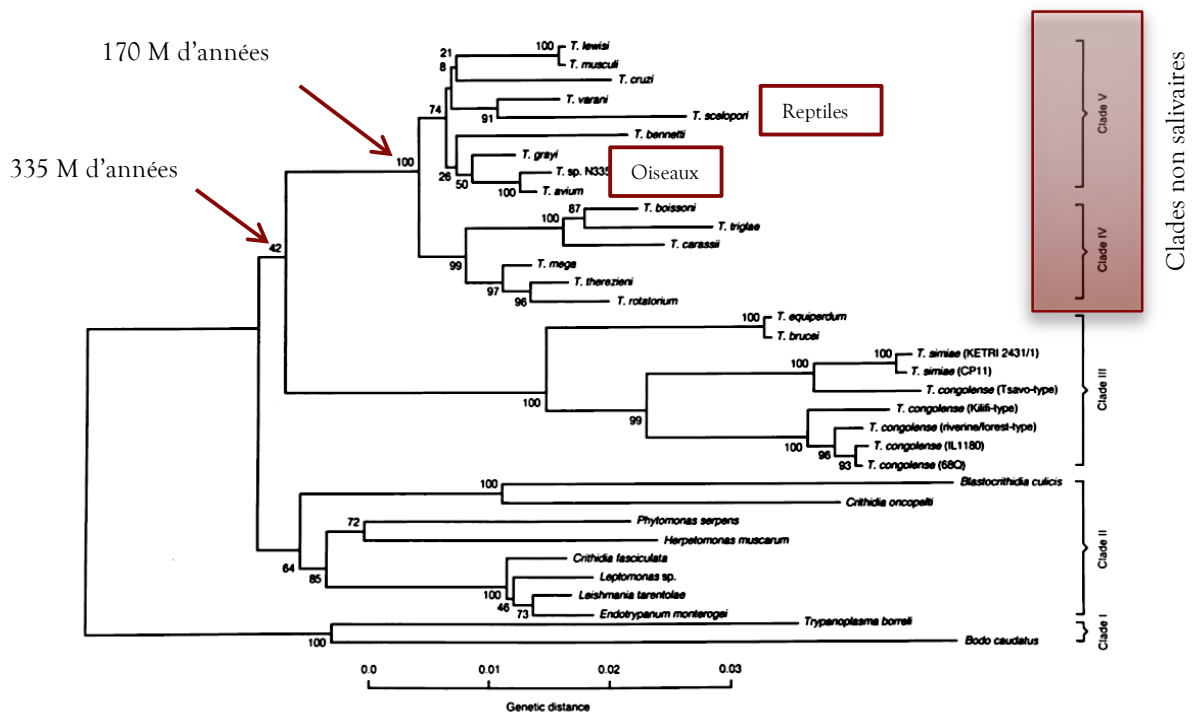


Figure 4 : Arbre de l'évolution de l'ordre des Kinétoplastidés comprenant les parasites du genre *Trypanosoma* et de la séparation entre les sections *Salivaria* et *Stercoraria*

Schéma d'après (Haag 1998) : Le Clade III correspond aux Salivaires et les Clades IV et V aux non Salivaires, les Salivaires et les non Salivaires se seraient séparés il y a environ 335 M d'années. Les reptiles et les oiseaux sont des exemples d'hôtes potentiels de trypanosomes.

La paléo-parasitologie a permis de démontrer que nos ancêtres les hominidés ont évolué dans un environnement où la trypanosomiase était présente. Il est en effet très probable que la trypanosomiase ait joué un rôle conséquent dans la sélection naturelle, permettant à l'Homme, tout comme à l'Animal d'acquérir des résistances contre la parasitose et de survivre dans les milieux infestés ou de mourir, mettant un terme à cette cohabitation délétère.

De même, seules les souches les moins virulentes du parasite, et par là même, celles qui pouvaient être transmises, sont aujourd'hui encore présentes. La trypanosomiase est un bon exemple de co-évolution entre deux espèces. Aujourd'hui on trouve encore de nombreux exemples d'animaux trypanotolérants (par exemple les bovins N'Dama, Muturu and Dahomey) qui vivent dans les lieux de résidence des tsé-tsé et on peut imaginer que les animaux qui n'ont pas acquis de résistance ont disparu de certaines

niches écologiques ce qui explique encore aujourd'hui la répartition géographique de certaines espèces.

Les chercheurs ont aussi démontré que la tsé-tsé était présente sur le continent Américain et partout dans le monde il y a plus de 35 millions d'années, mais qu'une baisse conséquente des températures a conduit à son extinction lors des glaciations du Pleistocène et à sa préservation uniquement dans son habitat d'origine en Afrique (Lambrecht 1985).

Certains usages de l'antiquité attestent aujourd'hui que la Nagana, pathologie vétérinaire, était bien connue des africains et en particuliers des égyptiens, qui perdaient à cause de cette maladie, une grande partie de leurs troupeaux. Ils avaient cependant remarqué que les animaux sauvages n'étaient pas affectés par ce mal. Ils ont donc commencé à croiser leurs troupeaux avec le gibier afin d'obtenir des animaux résistants. Ils avaient donc déjà, à l'époque, la notion de trypanotolérance. Une description de cette affection des bestiaux a été retrouvée dans le Papyrus Vétérinaire de Kahun Papyri datant de 2000 ans avant JC.

Au XIIIème siècle, Abu Abdallah Yaqut, un géographe, décrit un village où « les gens et les chiens n'avaient que peau sur les os et semblaient dormir au beau milieu du jour ». Ce tableau pourrait dépeindre un village atteint de trypanosomiase africaine. Pendant ce temps les migrations des peuples autochtones d'Égypte, nécessaire lors de l'augmentation de la sécheresse du Sahara, se faisaient jusqu'au Sénégal en évitant soigneusement les lieux de colonisation des glossines. Les Hommes de cette époque, avaient à l'évidence déjà fait le lien entre la tsé-tsé et la mort de leurs troupeaux.

Ce n'est pourtant qu'au milieu du XIVème siècle que le premier cas de maladie du sommeil fut rapporté par l'historien Ibn Khaldun. Dans son livre, il raconta la mort du Sultan Mari Jata, empereur du Mali et sa description des symptômes de la maladie correspondait à la maladie du sommeil, son agonie dura, disait-on 2 longues années et il mourut en 1374. Quand le commerce des esclaves commença à sévir en Afrique, les pertes humaines des Hommes mis en esclavage alertèrent les autorités sanitaires de l'époque.

En 1734, le chirurgien John Aktins publia le premier rapport médical concernant la physiopathologie de la maladie du sommeil et traitant notamment de sa phase terminale neurologique. Bien plus tard, Thomas Winterbottom publia en 1803 un rapport concernant la forme précoce de la maladie, un ganglion lymphatique enflé au niveau de la nuque. En Afrique, les Hommes qui étaient porteurs de ce ganglion n'étaient pas achetés par les revendeurs d'esclaves qui avaient associé sa présence avec leur mort prochaine.

En 1894-1895, le microbiologiste et pathologiste écossais David Bruce, découvrit que *Trypanosoma brucei* était l'agent en cause de la Nagana. Bien d'autres scientifiques de l'époque avaient déjà découvert la présence de trypanosomes dans le sang d'animaux et l'avaient attribuée à d'autres pathologies comme par exemple *Trypanosoma evansi*, découvert par Evans en 1880 dans le sang de chameaux, de chevaux et d'ânes et qu'il avait associé à la Surra (Desquesnes, Holzmuller, et al. 2013).

La première fois que le trypanosome africain fut observé dans le sang d'un humain, ce fut en 1901 sous le microscope du Dr. Robert Michael Forde. Ce dernier avait bien visualisé le parasite mais était bien en peine de le nommer. Son contemporain, le physicien Joseph Everett Dutton, lui apprit que ce qu'il observait dans le sang du capitaine de marine Kelly, n'était pas un ver mais un trypanosome. Le bateau du capitaine infecté s'appelait « le Gambia » et il fut donc proposé en 1902 d'appeler ce trypanosome *Trypanosoma gambiense*.

Le parasite fut retrouvé une nouvelle fois le 12 Novembre 1902 par le Dr. Aldo Castellani dans le liquide céphalo-rachidien d'un patient africain atteint de maladie du sommeil. Il n'attribua pas de suite la pathologie à la présence du parasite mais fit le lien quelques mois plus tard entre la Maladie du Sommeil (Seeliger et Seefried 1989) et le trypanosome africain.

Une année plus tard le Dr David Bruce démontra, avec raison, que la mouche tsétsé ou glossine, était le vecteur qui transmettait le trypanosome aux humains. Il fit des expériences exposant des animaux sains au milieu de champs infestés de glossine et eut la joie quelque peu sordide de confirmer sa théorie de transmission quand quelques semaines plus tard, les animaux étaient porteurs de trypanosomes.

D'abord convaincu de la transmission mécanique du parasite par piqûre de Glossine, Bruce se rangea à la théorie du Dr. Friedrich Karl Kleine qui expliquait avec une grande ingéniosité qu'il existait un cycle dans la tsé-tsé. Ainsi Bruce décrit le cycle dans l'insecte dans son intégralité (Steveding 2008).

2.1.3 Description des acteurs de la trypanosomiase africaine

2.1.3.1 La glossine

La mouche tsé-tsé, ou glossine (Figure 5) est un diptère vecteur africain hématophage capable de transmettre à ses hôtes différentes espèces de trypanosomes. On répertorie aujourd'hui 31 espèces et sous espèces de tsé-tsé capables d'effectuer le cycle parasitaire. Les glossines sont infectées par les trypanosomes lors d'un repas sanguin qui dure environ 20 à 30 secondes (Franco et al. 2014) sur un hôte contaminé. Les glossines ténérales, c'est-à-dire qui effectuent leur premier repas sanguin, sont plus à même d'être contaminées par les parasites que les glossines ayant déjà effectué plusieurs repas de sang. Cependant, la contamination peut s'effectuer à n'importe quel moment de leur vie (Welburn et Maudlin 1992).

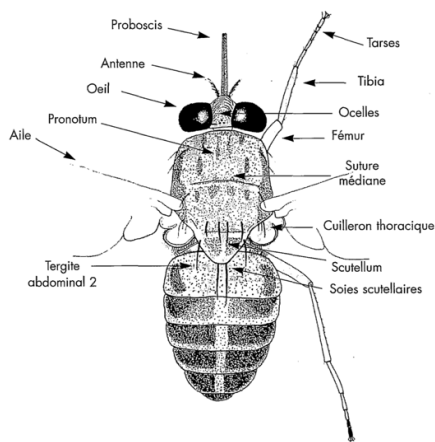


Figure 5 : Schéma d'une Glossine
Schéma issu de (Laveissière et al., s. d.)



Figure 6 : *Glossina mortisans*
D'après une image du Dr Brice Rotureau

Les glossines peuplent en général les forêts, les mangroves et les savanes mais se sont aussi adaptées aux villages, aux Niayes et aux caféières par exemple. Elles vivent dans des environnements où la température est comprise entre 16°C et 38°C et l'humidité entre 50% et 80%. Leur répartition est différente selon les espèces de glossine (Laveissière et al., s. d.).

Elles ont une taille de 6 à 16 mm sans compter le proboscis. Leur couleur varie du gris foncé au brun clair et elles peuvent porter de petites taches sur leur abdomen. L'appareil

piqueur est dirigé vers l'avant et leur vol est très rapide. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel. Sur la tête de l'insecte, une suture ptilinale permet de le reconnaître parmi les autres mouches. Sa survie dépend de la saison mais peut atteindre 9 mois en saison des pluies. Les mâles survivent en général moins longtemps que les femelles. *Trypanosoma brucei rhodesiense* est transmis par des glossines du groupe *Glossina morsitans* (Figure 6), tandis que *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 est transmis par les glossines du groupe *Glossina palpalis* (Cox 2004) et celles du groupe 2 par *Glossina morsitans*.

2.1.3.2 Le parasite

2.1.3.2.1 Généralités

Trypanosoma brucei est un parasite unicellulaire flagellé, sanguicole exo-érythrocytaire de l'ordre des kinétoplastidés. Sa forme particulière lui a donné son nom, dérivé du grec *Trupanon* qui veut dire trépan (Figure 7).

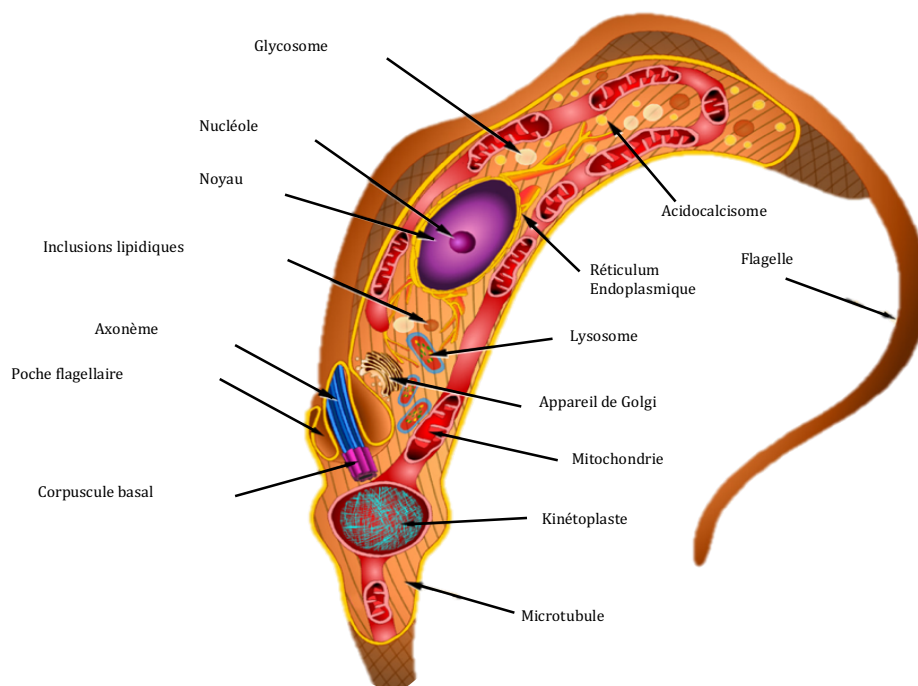


Figure 7 : Schéma d'un trypanosome forme sanguine

Adapté d'après (Teixeira et al. 2012) : Schéma du trypanosome africain forme sanguine, comprenant notamment le kinétoplaste, les glycosomes et la poche flagellaire, organites qui le distinguent tout particulièrement des autres microorganismes.

Il existe aujourd'hui deux sous-espèces en cause dans la trypanosomiase africaine humaine : *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *Trypanosoma brucei gambiense* qui peut être subdivisé en deux sous-groupes, *T.b.gambiense* 1 et *T.b.gambiense* 2. La présence du deuxième étant de moindre importance mais possédant un réservoir animal. (Jamonneau et al. 2019)

Le trypanosome africain est une cellule diploïde qui possède environ 10 000 gènes répartis sur 11 paires de chromosomes. Il possède aussi des mini-chromosomes et des chromosomes intermédiaires haploïdes généralement, ainsi qu'un large répertoire de gènes codants pour les protéines de l'antigène majeur de surface ou VSG (Variable Surface Glycoprotein). Les gènes du trypanosome semblent tous transcrits de manière constitutive en de longs transcrits polycistroniques. Les ARN sont stabilisés au niveau de la région 3' non traduite.

2.1.3.2.2 Le VSG

Le VSG est une protéine parasitaire composant un manteau membranaire protéique d'environ 15 nm qui recouvre le parasite. Il est exprimé de manière mono-allélique, c'est à dire qu'un seul type de protéine VSG est exprimé en grande quantité à la surface de chaque trypanosome, ceci est sous la dépendance du gène VEX-1 (VSG-exclusion-1)(Aresta-Branco, Erben, et al. 2019). Dans une population de parasites, il existe, à chaque instant, un VSG que l'on appelle « majoritaire » et des variants dits « minoritaires ». Ces variants sont présents en grand nombre, et exprimés avec le variant majoritaire. Ce mécanisme de variation antigénique permet au parasite de se cacher du système immunitaire. En effet, quand le système immunitaire de l'hôte s'est doté d'une solide réponse dirigée contre ce variant majoritaire du VSG, un autre variant déjà présent, prend le relais, devient majoritaire et le cycle de l'infection peut continuer (Mugnier, Cross, et Papavasiliou 2015). En effet, il a été décrit que le pool de VSG de surface est renouvelé toutes les 12 min (Engstler et al. 2004). Dans une étude *in vivo*, les chercheurs ont mis en évidence la présence d'environ 28 variants à chaque moment de l'infection.

Le VSG peut être codé par environ 2000 gènes ou pseudogènes ce qui constitue un répertoire quasiment infini de combinaisons (Cooper et al. 2016). Ces gènes, pour 80% incomplets, se retrouvent dans plusieurs parties du génome et notamment sur des mini-chromosomes, abondants chez *Trypanosoma brucei*. Les nombreux emplacements et la quantité de gènes différents permettent une grande variabilité du VSG (Taylor et

Rudenko 2006). Le VSG est transcrit par l'ARN Polymerase I. Pour se faire, il doit être situé dans un des 15 sites d'expression et il doit être présent dans une région que l'on appelle ESB (expression site body). Il existe quatre mécanismes pouvant amener au changement de l'expression d'un VSG (Figure 8) :

- la conversion de gènes (qui est le mécanisme le plus important),
- la conversion segmentaire de gènes
- les échanges de télomères
- le switch *in situ* (Taylor et Rudenko 2006).

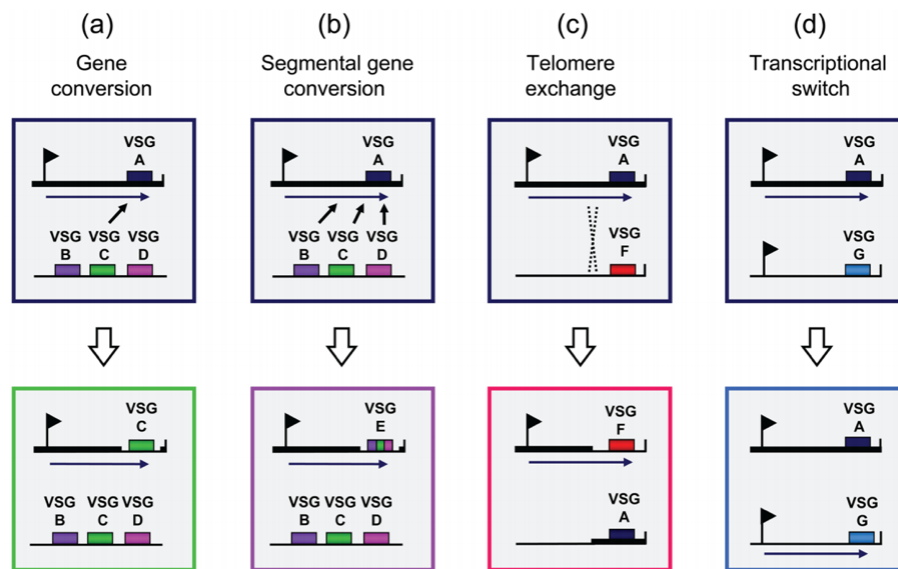


Figure 8 : Mécanismes de modification du VSG permettant la variation antigénique

D'après (Vink, Rudenko, et Seifert 2012): Mécanismes de commutation VSG chez *Trypanosoma brucei*. Le gène VSG actif est transcrit à partir d'un seul site actif d'expression télomérique de VSG (ES), avec le promoteur ES indiqué par un drapeau, et la transcription avec une flèche. (a) Le changement de VSG médié par conversion génique duplicative implique la copie d'un VSG silencieux dans l'ES actif, remplaçant ainsi l'ancien VSG. (b) La commutation VSG médiée par la conversion de gène segmentaire implique la recombinaison de segments de plusieurs gènes et pseudogènes VSG, résultant en la génération d'un nouveau VSG mosaïque. (c) La commutation VSG médiée par l'échange de télomères implique un croisement d'ADN sur deux télomères. Un télomère auparavant silencieux est échangé dans l'ES actif, et le VSG précédemment actif est déplacé vers un télomère silencieux. (d) La commutation VSG peut être médiée par le contrôle transcriptionnel par lequel un ES auparavant silencieux est activé et l'ES actif est réduit au silence.

En plus de permuter son VSG avec les techniques décrites, certains auteurs expliquent que des mutations post-traductionnelles de type O-glycosylation par exemple, permettent une modification des domaines NTD (N-terminal domain) ce qui modifie l'antigénicité des VSG. Il a aussi été montré qu'un échange entre les différents domaines C-ter (C-terminal domain) du VSG, rendent les lymphocytes B moins fonctionnels même s'ils ont déjà reconnu la partie N-ter précédemment. De même il apparaît possible que

les parties N-terminale et C-terminale du VSG s'inversent, apportant à la variation antigénique de nouvelles combinaisons (Aresta-Branco, Erben, et al. 2019) (Figure 9).

Le parallèle entre la création des différents isotopes de Lymphocytes B (hypermutation somatique) et la formation du VSG a été établi (Figure 9). On aurait donc pu penser que comme la région constante des anticorps, la partie C-terminale du VSG, par analogie, aurait pu être relativement fixe, non variable.

En effet, il avait été décrit récemment que bien que le VSG ne soit pas, en soit, une cible idéale pour la vaccination à cause de l'hypervariabilité des régions N-terminales, sa partie C-terminale serait une partie constante que l'on pourrait cibler à l'aide d'anticorps.

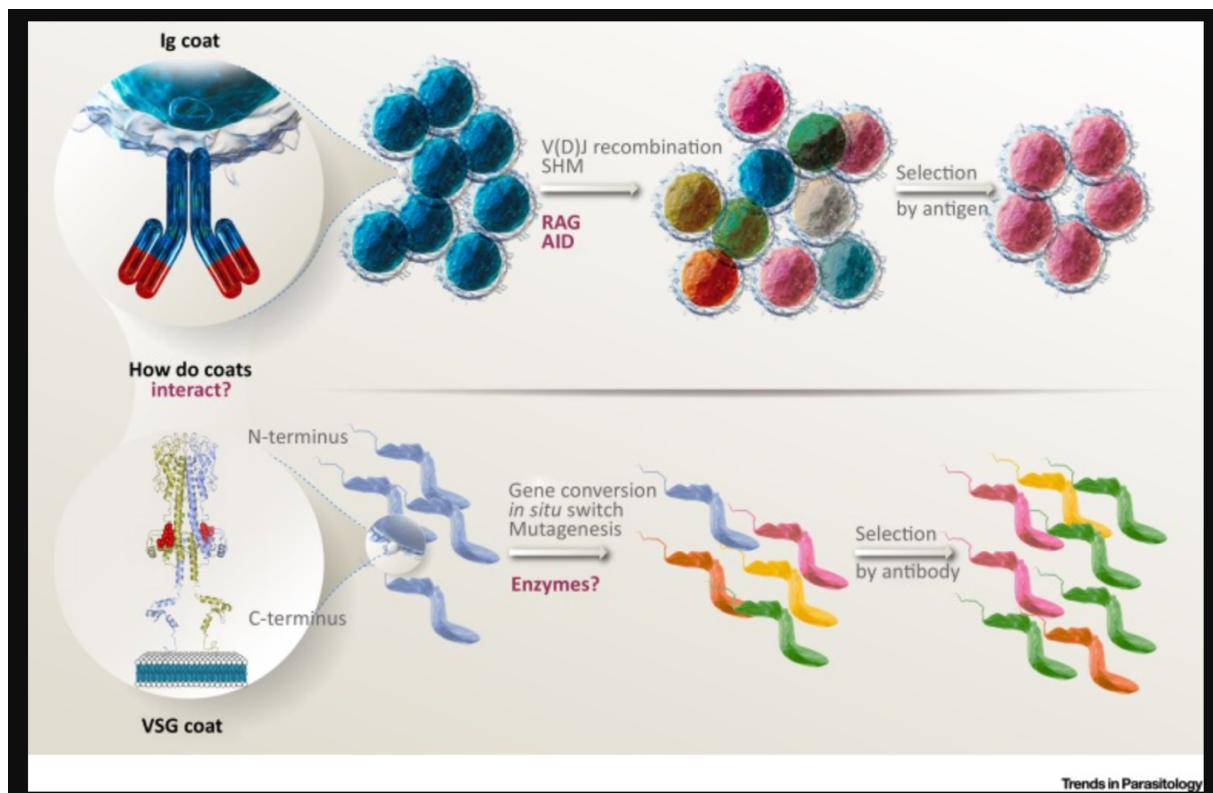


Figure 9 : Comparaison entre l'hypermutation des Lymphocytes B et la complexité du VSG parasitaire

D'après (Aresta-Branco, Erben, et al. 2019) : La diversification des cellules B, présentée ici comme le résultat du processus combiné de recombinaison V (D) J et d'hypermutation somatique (SHM), se produit en parallèle avec la variation antigénique de *Trypanosoma brucei*. Alors que les catalyseurs de diversification des cellules B (sous la forme de recombinaison V (D) J et SHM) sont enzymatiques (via RAG et cytidine désaminase induite par activation, AID), le processus qui catalyse la commutation VSG reste incertain.

Cependant, elle est très difficilement atteignable par le système immunitaire comme l'autre famille de candidats prometteurs à la vaccination, les ISG (Invariant Surface

Glycoprotein) et malgré une preuve de concept sur des souris, la partie C-terminale ne peut pas être utilisée non plus dans la vaccination (Black et Mansfield 2016). Il existe un gène le *tdp1* qui permet de garder la chromatine codant le VSG accessible à la transcription et donc au parasite de coder pour plusieurs VSG en même temps. Il a été montré que des souris préalablement infectées par ces parasites aux VSG multiples contrôlent la parasitémie, voire guérissent lorsqu'elles sont mises une deuxième fois en contact avec le parasite (Aresta-Branco, Sanches-Vaz, et al. 2019).

Au niveau protéique, le VSG est constitué d'environ 400 à 500 résidus sous forme de dimères ou d'oligomères. Il est relié à la membrane plasmique du parasite par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et plus particulièrement *via* un dimyristoyl glycosylphosphatidylinositol au niveau de la partie C-terminale du VSG. Certaines études *in silico* tendraient à expliquer que les métalloprotéinases pourraient être impliquées dans le relargage du VSG (Moreno, Torres, et Silva 2019). En effet, certains antibiotiques de la famille des tétracyclines qui possèdent en plus de leur activité anti-microbienne, une activité d'inhibiteurs de métalloprotéinases, montrent une diminution de la virulence du parasite chez la souris. De plus, si l'on supprime l'activité de la Phospholipase C (PLC) et de la TbMSP-B (Major Surface Protease), le remodelage du VSG ne peut pas se faire et la différenciation de la forme sanguine en procyclique est impossible (Moreno, Torres, et Silva 2019).

Plus on l'étudie, plus la compréhension des mécanismes qui entourent le remodelage du VSG tend paradoxalement à amoindrir les chances d'en faire une cible vaccinale. Cela a cependant pour effet d'accroître l'émerveillement pour une capacité de survie presque illimitée de ce parasite ancestral.

2.1.3.2.3 Les glycosomes

Les glycosomes sont des peroxyosomes spécialisés présents dans les trypanosomes et plus généralement dans l'ordre des kinétoplastidés. Il manque cependant à ces glycosomes une enzyme-clé au métabolisme classique du peroxyosome, la catalase. Ils possèdent néanmoins un intérêt notable puisque ce compartiment cellulaire renferme bon nombre d'enzymes de la voie de la glycolyse (Achcar, Kerkhoven, et Barrett 2014), de la fermentation succinique et de la voie des pentoses phosphates par exemple.

Un glycosome est composé d'une membrane unique par laquelle s'effectue le transfert passif de petites molécules et un certain nombre de pores permettant les échanges avec

le cytoplasme de la cellule. Le regroupement des enzymes permettant au parasite de créer de l'énergie serait une stratégie pour faciliter la production d'énergie et favoriser le parasitisme (Allmann et Bringaud 2017). Le parasite peut ainsi s'adapter aux différentes sources de carbone disponibles.

De manière générale, les formes sanguines du parasite possèdent plus de glycosomes (environ 65) que les formes procycliques (environ 20). Certaines protéines qui le constituent sont déjà bien connues. La division du glycosome implique par exemple la présence de la protéine PEX11 alors que la protéine PEX14 est une protéine associée à la membrane de ce compartiment (Bauer et Morris 2017). La majorité des lipides d'un glycosome sont d'abord synthétisés dans le réticulum endoplasmique. Un phénomène particulier, la pexophagie, entraînerait la dégradation du peroxysome dans le lysosome et permettrait ainsi l'adaptation des enzymes présentes dans le parasite à ses besoins, phénomène aussi observé chez les plantes (Borek et al. 2019). En effet, quand les besoins métaboliques du parasite changent, la reprogrammation inclut le remplacement des glycosomes existants, qui ne comprennent pas les enzymes nécessaires aux besoins actuels du parasite. Cependant le contenu des glycosomes est relativement stable ce qui implique que l'on observerait cette pexophagie plus facilement lors des changements d'état du parasite, quand il passe de la forme allongée à la forme trapue ou de la forme sanguine à la forme procyclique. La machinerie d'import de protéines à l'intérieur d'un glycosome se fait, à l'image du peroxysome, par les Peroxines ou PEX-protéines notamment PEX5 ou PEX7.

Il y a environ 250 protéines du parasite dont la localisation serait glycosomale (Haanstra et al. 2016). Lorsqu'une protéine vient d'être synthétisée et possède à son extrémité C-terminale un signal d'adressage au glycosome, appelé PTS1 (Peroxisome Targetting Signal 1), elle entre dans le glycosome à l'aide de la protéine PEX5. Quand la protéine possède un motif spécifique appelé PTS2 au niveau de son extrémité N-terminale, elle est prise en charge par la protéine PEX7. Des enzymes comme la TPI ou la PGK-A ne possèdent pas de signal d'adressage au glycosome et sont transportées par leur association à une protéine qui possède un système fonctionnel d'import pour entrer dans le glycosome. Cela se nomme le « piggy-backing » (Haanstra et al. 2016).

Au-delà de ces signaux spécifiques d'adressage, une protéine particulière, la protéine TbPEX3, serait impliquée dans la biogenèse des glycosomes et dans l'adressage des

protéines. En effet, même en présence d'un signal d'adressage au glycosome, en absence de TbPEX3, les protéines ont une localisation cytoplasmique. Il paraît donc évident que nous ne connaissons pas encore toutes les subtilités de ce compartiment si particulier (Banerjee, Knoblach, et Rachubinski 2019).

2.1.3.2.4 Le kinétoplaste

Le kinétoplaste est un compartiment singulier permettant de classer les trypanosomes africains dans l'ordre des Kinétoplastidés (Figure 10). Il est composé d'ADN mitochondrial circulaire intracatéché avec des maximolécules et des minimolécules circulaires et se situe à la base du flagelle. Ces dernières contiennent des ARN guide. Ces ARN guide permettent l'édition de l'ARN c'est-à-dire qu'ils modifient par insertion ou délétion de résidus U, l'ADN des maximolécules. Ce processus a une place plus importante chez les kinétoplastidés que chez les autres êtres vivants. Il est cependant intéressant de noter que certains trypanosomes phylogénétiquement proches de *T.brucei* comme l'espèce *evansi* ont perdu tout ou une partie de leur kinétoplaste.

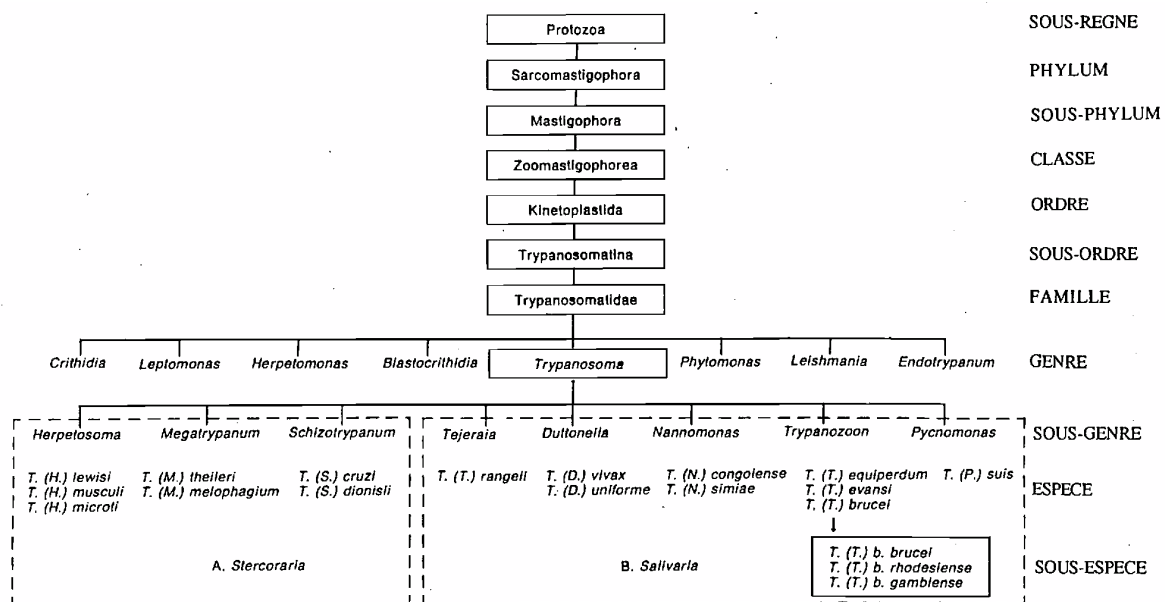


Figure 10 : Classification phylogénétique des trypanosomes africains

D'après (Truc, s. d.)

2.1.3.2.5 Le cytosquelette : le flagelle et les microtubules

Au cours du cycle cellulaire, le cytosquelette est en perpétuelle évolution. Cette structure dynamique permet le remodelage de l'architecture cellulaire et le positionnement des différents autres organites. Il est la structure de base du trypanosome, constitué par un réseau dense de microtubules (essentiellement de tubuline) qui entourent la cellule sous la membrane plasmique. Au niveau de l'insertion du flagelle, se trouve la poche flagellaire, lieu privilégié d'échange du trypanosome avec le milieu extérieur.

Dans la forme sanguine du trypanosome, la poche flagellaire permet le remodelage du VSG qui est internalisé pour recyclage et peut-être lié aux anticorps de l'hôte (Webster et Russell 1993). Le flagelle s'étale sur l'entière longueur du parasite et lui permet une mobilité extraordinaire. Une membrane ondulante relie ce dernier au corps du parasite, lui donnant l'aspect d'un petit dragon.

2.1.3.2.6 Le sécrétome

Les protéines, les lipides et les hydrates de carbone excrétés et sécrétés par le parasite, forment ce que l'on appelle le sécrétome. Cette sécrétion a lieu à travers la poche flagellaire ou par l'exocytose de vésicules. Tandis que certains facteurs peuvent être relargués par le parasite car ils ont un potentiel toxique dans le milieu intracellulaire, d'autres serviraient à la protection du parasite, à moduler le système immunitaire de l'hôte, à récupérer des éléments nutritifs ou à déstabiliser les constituants cellulaires pour favoriser la dissémination (Bossard, Cuny, et Geiger 2013) (Figure 11).

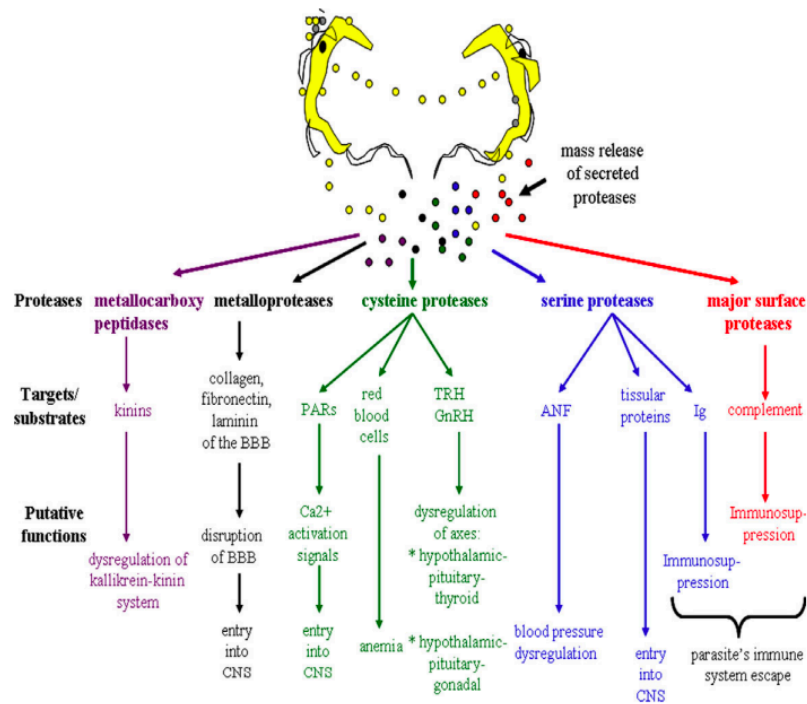


Figure 11 : Exemple de protéines sécrétées par le trypanosome et leur rôle dans sa survie et dans la physiopathologie

D'après (Bossard, Cuny, et Geiger 2013)

Il existe un motif en N-terminal qui prédit la sécrétion d'une protéine. Dans le protéome de *Trypanosoma brucei*, les chercheurs ont identifié 1445 protéines qui devraient être sécrétées/excrétées. Les expériences révèlent pourtant que moins de 20% des protéines retrouvées dans le sécrétome ont ce peptide signal de sécrétion et 5 % ont un domaine transmembranaire. Les auteurs pensent donc que le trypanosome utilise des microvésicules pour sécréter des protéines qui n'ont pas le signal cellulaire d'adressage (Geiger et al. 2010).

Dans une autre étude portant sur le sécrétome de la forme sanguine de *Trypanosoma congolense*, il est montré que 87% des protéines sécrétées sont des enzymes. Ce qui est très intéressant dans cette étude est que certaines protéines sont glycosomales, comme la glyceraldéhyde phosphate déshydrogénase, et sont pourtant retrouvées dans le milieu extérieur, posant la question de la voie d'excrétion de ces protéines et du recyclage des glycosomes (Grébaut et al. 2009).

Pourquoi s'intéresser aux protéines sécrétées dans le milieu ?

Pour prendre un exemple concret concernant les études menées dans le laboratoire où j'effectue ma thèse, nous présenterons succinctement quelques données concernant l'anémie, symptôme premier de la Nagana. Certains facteurs de virulence seraient

relargués dans des vésicules extracellulaires et fusionneraient avec les globules rouges, entraînant la formation d'un globule rouge remanié, plus rigide et plus facilement pris en charge par le système érythro-phagocytaire, se traduisant par une anémie périphérique. La quantité de vésicules dans le sang de l'hôte est proportionnelle au nombre de parasites et au degré de sévérité de l'anémie. On peut donc en conclure que certains facteurs sécrétés sont en partie responsables de la symptomatologie de la pathologie (Szempruch et al. 2016). La compréhension des mécanismes de l'anémie (Stijlemans et al. 2015), pousse les chercheurs à trouver dans les facteurs sécrétés ceux qui pourraient avoir un rôle prépondérant dans la physiopathologie de la trypanosomiase africaine.

Une revue (Stijlemans et al. 2018) répertorie les différents facteurs déjà connus comme prenant part à la symptomatologie de l'anémie. C'est par exemple le cas du VSG qui entraîne le recrutement excessif de macrophages et donc la surproduction de TNF, IL6, IL8 IFN γ et NO induisant une anémie inflammatoire et une cachexie. Une anémie centrale trouverait un début d'explication dans la surproduction de l'IFN γ , induisant une down régulation des récepteurs de l'Epo dans la moelle osseuse et donc la formation des précurseurs myéloïdes. Les sialidases entraîneraient quant à elles une réduction de l'érythropoïèse, une augmentation de l'érythrophagocytose et une altération directe des globules rouges (Guegan et al. 2013). Cela explique, comme vu dans le paragraphe traitant de ce sujet, pourquoi certains animaux qui possèdent une plus grande quantité de résidus d'acide sialique O-acétylé sur leurs globules rouges sont trypanotolérants (Antoine-Moussiaux, Büscher, et Desmecht 2009).

Concernant mon sujet de thèse, certaines protéines telles les phospholipases, ont été retrouvées dans le sécrétome des trypanosome africains (Geiger et al. 2010). De par leur mode d'action particulier sur le catabolisme des lipides et donc sur les membranes qui en sont majoritairement constituées, elles pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'anémie, symptôme majeur de la Nagana. Elles pourraient aussi potentiellement agir sur les endothéliums par exemple, permettant le passage du parasite à travers les tissus. Si nous pouvions comparer les sécrétomes de parasites tel que le *Trypanosoma brucei*, capable de traverser la BHE, à celui de trypanosomes uniquement présents dans les vaisseaux sanguins comme le *Trypanosoma congolense*, serions-nous capables de déterminer les facteurs parasitaires nécessaires au passage en phase terminale de la trypanosomiase africaine, ces facteurs spéciaux, sont-ils sécrétés ?

2.1.3.3 Le cycle du parasite

Dans les années 1960-1970, certains scientifiques pensaient qu'à l'image de *Trypanosoma cruzi* et des Leishmanies, qui font aussi partie de l'ordre des kinétoplastidés, les trypanosomes africains possédaient un stade amastigote (Ormerod et Venkatesan 1971), c'est à dire une forme intracellulaire dépourvue de flagelle. Depuis ces années-là, aucune forme de cette sorte n'a été observée chez les hôtes. Cependant, plus récemment, d'autres chercheurs ont montré que le trypanosome africain aurait la faculté d'entrer dans les cellules endothéliales composant la barrière méningée et sont tentés de dire que c'est grâce à cette invasion intracellulaire, que le parasite entre ensuite dans le cerveau à proprement parlé. Ils n'excluent cependant pas que le parasite puisse se retrouver dans les lysosomes en stade terminal de vie (Nikolskaia et al. 2006).

La reproduction du trypanosome africain a longtemps été décrite comme se produisant exclusivement par scissiparité. Une équipe de chercheurs s'est pourtant intéressée à la transmission de certains caractères permettant, par exemple, la résistance aux anti-infectieux, à travers les différentes souches prélevées sur le terrain. En effet, d'autres microorganismes comme les bactéries, sont capables de transmettre de manière horizontale leurs résistances acquises ou innées à certains antibiotiques, à d'autres bactéries receveuses. Etant donné la difficulté de traitement de la trypanosomiase africaine, comprendre ces mécanismes semblait essentiel. Ces chercheurs ont donc étudié, d'après des observations basées sur d'autres Kinétoplastidés, la possibilité de méiose des parasites, permettant une transmission Mendélienne.

En étudiant certains gènes connus pour intervenir particulièrement dans les processus de méiose chez les plantes supérieures, les levures et les animaux, cette équipe a déterminé l'expression de ces gènes (Spo11, Mnd1, Dmc1 et Hop1) dans le trypanosome africain. Ainsi ils en ont conclu que ces processus de méiose sont très peu fréquents et ont lieu uniquement lorsque le parasite se trouve dans les glandes salivaires de l'insecte vecteur sous sa forme épimastigote. Le vecteur doit être infecté par deux souches de trypanosomes différentes (Peacock et al. 2011) et la méiose a lieu entre le 14^{ème} et le 38^{ème} jour post-infection (Gibson 2015). Cela pose beaucoup de conditions pour la survenue de ce phénomène et d'autant plus pour les parasites comme *Trypanosoma evansi*, qui, bien qu'il puisse se retrouver dans les glandes salivaires du vecteur, ne

possède pas de cycle à proprement parlé. Cependant, de manière consensuelle, nous ne parlerons ni de forme intracellulaire, ni de forme asexuée. Le cycle du parasite peut se décrire comme suit (Figure 12) :

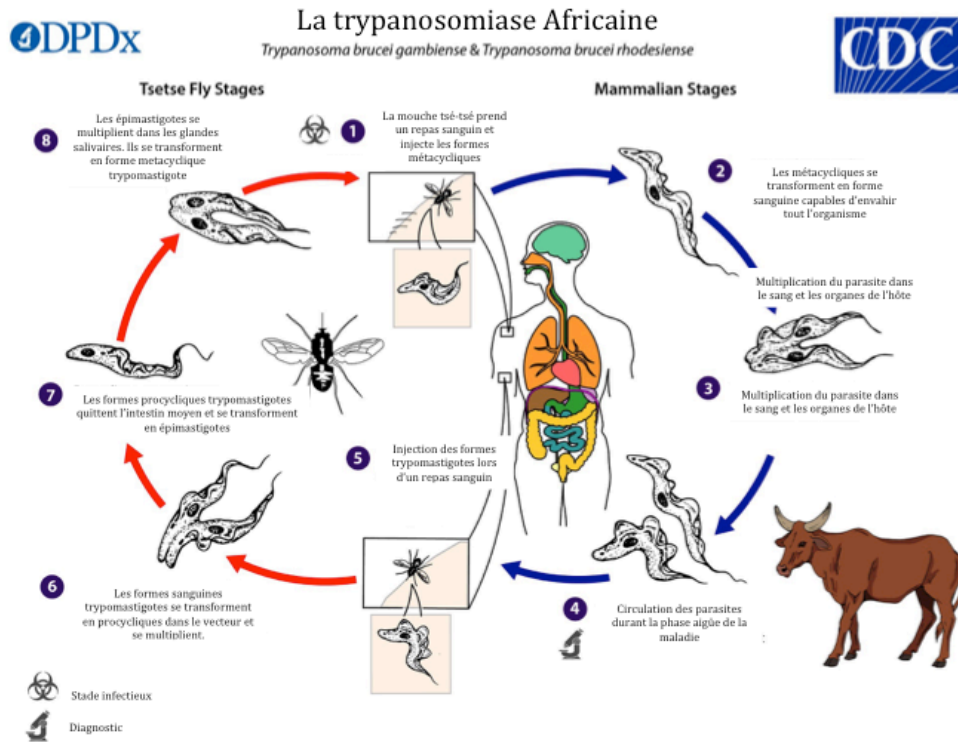


Figure 12 : Cycle de vie du trypanosome africain

D'après le CDC, détaillé dans le paragraphe 2.1.3.3-Cycle du parasite- de ce document.

Un hôte mammifère contaminé par un trypanosome sous sa forme sanguine, se fait piquer par une glossine. Cette glossine prend alors un repas de sang contaminant et ingère des formes allongées du parasite « slender » d'environ 23 à 30 µm et des formes trapues, en phase G0 de quiescence « stumpy » de 12 à 26 µm. Les formes stumpy sont des formes pré-adaptées à la vie dans l'insecte, c'est-à-dire que le métabolisme du trypanosome est modifié à ce stade pour s'adapter aux conditions et aux sources nutritives présentes dans la tsé-tsé. Par exemple, les formes stumpy down-régulent les protéines impliquées dans la glycolyse ou le transport du glucose mais augmentent les procyclines et les PAD, de même que les enzymes associées au clivage du VSG.

On observe aussi une modification d'expression des protéines du cytosquelette, de la membrane et surtout de la biogenèse des lipides (Rico et al. 2013). Cette préadaptation et l'apparition de formes stumpy a lieu à la suite de l'émission d'une molécule signal

soluble, sécrétée par les trypanosomes sanguins que l'on appelle le SIF (Stumpy induction factor) (Figure 13).

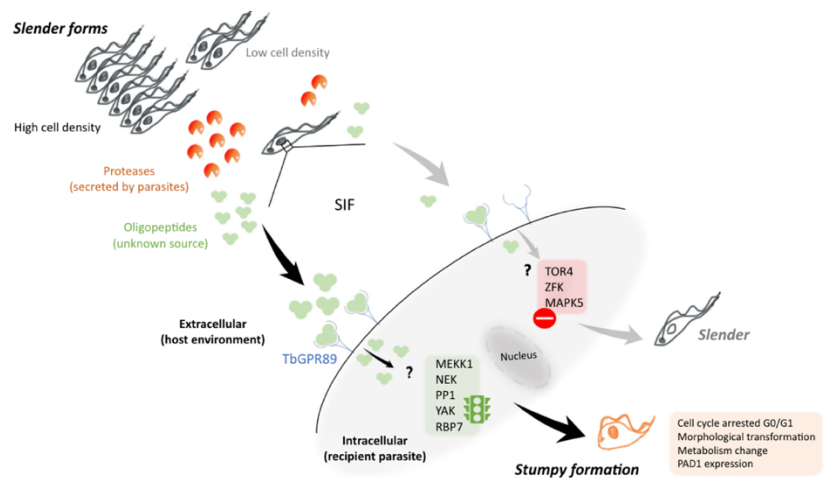


Figure 13 : Sécrétion du SIF entraînant l'apparition de formes stumpy

D'après (Sollelis et Marti 2019) : Les parasites sanguins sécrètent des protéases qui entraînent la formation d'oligopeptides particuliers qui seraient reconnus par les parasites eux-mêmes. Lorsque la densité de parasites est élevée, ces oligopeptides appelés SIF entraînent une voie de signalisation qui arrête le cycle cellulaire, faisant passer les parasites de la forme allongée, slender, à la forme trapue ou stumpy.

Les formes sanguines auraient la capacité de sentir leur densité par un phénomène de quorum sensing correspondant à l'abondance de SIF. Plus les parasites sont nombreux, plus la quantité de SIF est importante, et plus cela induira la formation de stumpy (Sollelis et Marti 2019). Pour rentrer dans les détails de la découverte du SIF, à ce jour, il est admis que les formes sanguines sécrètent des peptidases dans le milieu extérieur ce qui permet la formation d'oligopeptides spécifiques, internalisés par le transporteur TbGRP89 induisant la formation de formes stumpy (Rojas et al. 2019). Lors de l'absorption des parasites par la glossine, les formes allongées non adaptées disparaîtraient et les stumpy permettraient la continuation du cycle. Le taux d'infection des tsé-tsé est très bas mais si une glossine est vectrice de la trypanosomiase, elle le restera toute sa vie.

Dans l'insecte, le parasite change d'environnement de vie et passe par plusieurs stades de différenciation. Les formes stumpy se retrouvent privées de glucose et en contact avec les protéases de l'intestin. Les parasites vont alors se modifier en quelques heures en formes procycliques non infectantes pour le mammifère, dans l'intestin de la mouche.

Cette nouvelle forme a la particularité d'être recouverte d'un manteau de procyclines, dont les deux formes majeures sont les EP et les GPEET, correspondant aux acides aminés répétés en C-term. Les procyclines sont fixées à la membrane du parasite par des ancras GPI particulières (Acosta-Serrano et al. 2001) et permettent au parasite de survivre à l'environnement agressif de l'estomac de la mouche.

Les formes procycliques vont se multiplier dans l'intestin moyen de la glossine puis migrer vers les glandes salivaires ou les pièces buccales où elles se changent en formes épimastigotes adhérentes aux tissus épithéliaux de l'insecte. C'est à ce moment que les épimastigotes se changent en formes non répliquatives, non adhérentes, métacycliques infectantes, pouvant être transmises à chaque repas de sang par la glossine vectrice. Lors de la transmission du parasite, la forme métacyclique, pourvue d'un manteau glycoprotéique simple, se modifie pour revêtir un manteau glycoprotéique bien plus complexe et caractéristique de la forme sanguine trypanomastigote.

Les parasites se retrouvent en 1 à 2 jours dans la lymphe malgré la formation du chancre et l'afflux de cellules du système immunitaire et en environ 5 jours dans le sang. Ils se multiplient alors par scissiparité dans le sang sous forme allongée. Quand la parasitémie est trop élevée, le parasite se change en forme trapue non répliquative destinée à être ingérée par un insecte qui continuera ainsi le cycle (Figure 14).

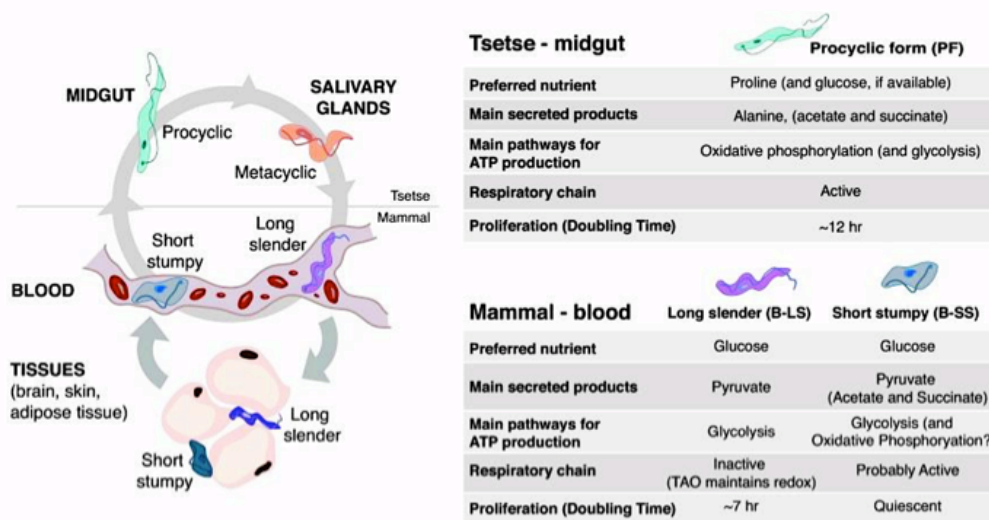


Figure 14 : Stade parasitaire selon le cycle évolutif du trypanosome africain

D'après (Smith et al. 2017) : Etat du parasite dans les différents tissus et détail de la consommation des ressources énergétiques selon son stade de développement dans l'insecte vecteur ou dans l'hôte mammifère. On observera par exemple que la forme procyclique préférera consommer de la proline alors que la forme sanguine se contentera de glucose.

2.1.4 Quelques Trypanosomes chez les animaux

2.1.4.1 *Trypanosoma vivax*

Trypanosoma vivax est le pathogène majeur des animaux domestiques en Afrique de l'ouest (Figure 15). Il a la particularité de se transmettre de deux manières : De façon cyclique en Afrique avec des vecteurs spécifiques, en faisant intervenir des glossines : *G. morsitans spp*, *G. longipalpis*, *G. palpalis*, *G. tachinoides*, et *G. pallidipes* et de manière mécanique, dans d'autres pays comme en Amérique latine en utilisant des insectes du genre *Atylotus*, des tabanides ou des *Stomoxys* (Ooi et al. 2016). Des observations sur cette transmission mécanique ont été rapportées dans une étude de terrain, en conditions presque sauvages de transmission et 75% des animaux auparavant sains sont contaminés en 20 jours. L'incidence est donc très importante, dépendante du nombre extrêmement élevé de morsures par jour (>50) et du pourcentage de repas interrompus (>50%) favorisant les contacts entre le sang des individus sains et le sang des individus contaminés (Desquesnes et Dia 2004). Il est intéressant de comprendre que ce trypanosome ne possède pas de stade procyclique et donc aucun gène codant pour la procycline qui recouvre les formes procycliques des autres espèces. *Trypanosoma vivax* passe de la forme sanguine à la forme épimastigote directement dans le proboscis de l'insecte sans passer par l'intestin moyen. Par contre une famille de gène de surface très spéciale *Fam27-45* les distingue des autres trypanosomes (Jackson et al. 2015).



Figure 15 : Bovins atteints de trypanosomiase animale

Pour *Trypanosoma vivax*, il semblerait au niveau physiopathologie que les animaux succombent à un pic de parasitémie, survenant lors de thromboses de gros vaisseaux. Dans chacun des cas de transmission, il existe une implication plutôt peu connue du système immunitaire et même des auto-réactions immunes qui sont cependant réversibles après traitements. La mort peut survenir d'un collapsus cardio-vasculaire, d'une anémie, d'une insuffisance rénale ou myocardique, d'une thrombose aiguë, ou encore d'une septicémie bactérienne secondaire, dépendant de la vulnérabilité de chaque individu (Goodwin 2008). Dans la nature, il est difficile d'imputer l'état de santé d'un animal à son infection par un parasite en particulier car on estime à 9,5% les cas de co-contamination par trypanosomes sur les échantillons prélevés sur les animaux porteurs de parasites (Gibson 2015).

2.1.4.2 *Trypanosoma congolense*

Trypanosoma congolense est responsable de 80% des infections des animaux d'élevage au sud de l'Éthiopie (Desta, Beyene, et Haile, s. d.). Il semblerait que cette espèce de trypanosome ait une incapacité à pénétrer dans les tissus et reste donc relativement cloisonné au compartiment sanguin. Sa symptomatologie se résume donc plus particulièrement à une anémie, une émaciation et une polio-encéphalomalacie. Le déclin des animaux d'élevage est essentiellement lié à l'anémie mais aussi à l'hypo-protéïnémie et la dilution du sérum dû au processus anaphylactique. Des conditions de culture de chacune de ses formes ont été mis au point en 2010 (Coustou et al. 2010) et revisités récemment (Kay, Peacock, et Gibson 2019).

Il existe trois sous espèces de ce parasite, le type « savanne », le type « forêt, rivière » et le type « kilifi ». Le sous-type des savannes semble le plus pathogène et induit systématiquement la mort des animaux infectés alors que la guérison survient pour les deux autres sous-types (Bengaly et al. 2002).

Certaines études de laboratoire et de terrain, ont montré que lors d'une parasitémie très élevée, notamment lors d'une infection à *Trypanosoma congolense*, si le repas de sang de l'insecte vecteur est interrompu, la glossine est capable de transmettre mécaniquement le parasite à un autre hôte et cela pendant au moins 160 minutes après le repas contaminant (L. W. Roberts et al. 1989).

2.1.4.3 *Trypanosoma equiperdum*

Trypanosoma equiperdum est une évolution des *Trypanosoma brucei* de l'Afrique de l'est (Cuypers et al. 2017). Ce trypanosome équin provoque une maladie appelée la Dourine qui évolue de manière chronique sur 1 à 2 ans. Ce trypanosome est un parasite tissulaire qui se transmet par voie sexuelle (Brun, Hecker, et Lun 1998). Les premiers signes sont une inflammation et un oedème de la vulve ou du pénis se propageant jusqu'à l'abdomen. Un signe particulier est aussi une conjonctivite et une kératite. La deuxième phase est pathognomonique de la dourine avec apparition durant 3 à 7 jours de plaques se répartissant possiblement sur tout le corps. Durant la phase terminale une anémie sévère apparaît avec des signes neurologiques conduisant à une paralysie et à la mort (Love et Mair 2012).

2.1.4.4 *Trypanosoma evansi*

Trypanosoma evansi est le parasite qui possède le plus grand nombre d'hôtes et la plus grande répartition mondiale. Il existe deux hypothèses quant à son évolution. Il dériverait de *Trypanosoma brucei* de l'Afrique de l'ouest (Cuypers et al. 2017) ou de *Trypanosoma equiperdum* (Brun, Hecker, et Lun 1998). Aujourd'hui, les scientifiques ont plutôt tendance à admettre qu'il a évolué à partir de *Trypanosoma brucei*. Sa particularité tient en son incapacité à établir un cycle chez le vecteur. En effet, il a perdu une partie de l'ADN mitochondrial (Desquesnes, Holzmuller, et al. 2013) (maxicercles) ou sa totalité, nécessaire au parasite pour évoluer en forme adaptée au vecteur. Afin de palier à ce manque, *Trypanosoma evansi* est capable de se transmettre mécaniquement, directement de l'animal-repas 1 à l'animal-repas 2.

Un grand nombre d'insectes piqueurs et suceurs font partie des vecteurs, mais les Tabanides sont les mouches qui transmettent le plus le parasite. Ces trypanosomes ne restent cependant pas longtemps vivants dans les vecteurs ce qui implique que les transmissions se font souvent dans des répartitions géographiques proches. Lors d'un repas interrompu, les mouches suceuses peuvent profiter de la plaie, se nourrir de sang et permettre une transmission horizontale, ce mécanisme particulier s'appelle la transfection. Ce qui inquiète les épidémiologistes aujourd'hui, est le fait que ce parasite se transmet aussi lors de l'ingestion de sang contaminé. Ainsi tous les carnivores vont être susceptibles de se contaminer en mangeant un herbivore parasité. Il a été décrit que

le parasite pouvait contaminer des humains s'ils sont porteurs de mutations génétiques particulières et qu'il possède chez les carnivores une phase amastigote, c'est-à-dire dépourvue de flagelle, dans les tissus comme le foie ou les yeux (Misra, Roy, et Choudhury 2016).

L'autre particularité de ce parasite est d'avoir pour réservoir et vecteur potentiel les chauves-souris. Ces dernières sont connues pour transmettre bon nombre de germes mais dans le cas du *Trypanosoma evansi*, si elles ne succombent pas à l'invasion parasitaire, elles vont être capable, à chaque morsure de transmettre le parasite. Elles deviennent alors des réservoirs permanents même en absence d'animaux contaminés (Desquesnes, Dargantes, et al. 2013).

Ce parasite cause une maladie communément appelée la Surra, dont la physiopathologie varie selon l'hôte (dromadaires, chevaux, chiens, porcs, buffles). La virulence est très importante chez les camélidés et les chevaux et sa forme clinique se traduit par une forme aiguë et fatale. De nombreux épisodes de fièvres précèdent une fatigue, une conjonctivite, une anémie, des oedèmes et des troubles nerveux conduisant au décès de l'animal allant de la somnolence à la paralysie généralisée puis la mort (Kocher 2013)

2.1.4.5 Les animaux trypanotolérants

La trypanotolérance n'est pas la capacité d'un hôte à se débarrasser du parasite qui l'infeste et d'obtenir une clairance, mais plutôt sa capacité à vivre en étant infesté sans en subir de dommages trop importants, sans que la maladie n'évolue et n'entraîne la mort (Naessens 2006). Cette tolérance connue de certains animaux envers le trypanosome est un mystère dont on découvre à travers le temps chacun des aspects. Certaines espèces ont été classées, par l'observation, dans le groupe des trypanotolérants. C'est le cas des N'Dama, des Sheko, des Muturu, des Baoule, des Djallonke, des Lagunaires et des chèvres Dwarf. Le buffle du Cap est la seule espèce de ruminant capable de résister complètement à toutes les espèces de trypanosome. Il faut noter que les co-infections avec d'autres parasites (helminthes par exemple) sont délétères aux animaux trypanotolérants (Yaro et al. 2016).

Les croisements progressifs des animaux trypanotolérants avec les animaux trypanosensibles engendrent une seconde génération d'animaux où les femelles semblent plus tolérantes que les mâles mais cette protection a tout de même tendance à se perdre très rapidement au fil des croisements.

Comme nous l'avons dit plus haut, la trypanotolérance est connue dans son aspect conceptuel depuis des millénaires. Cependant, du point de vue génétique et phénotypique, de nombreuses hypothèses ont été avancées et il semble qu'une combinaison de la plupart d'entre elles ne soit que le début de l'explication de ce phénomène de l'évolution.

Lors de la Nagana, l'anémie est le symptôme majeur, entraînant un affaiblissement et à terme, la mort de l'hôte. Quand survient le pic parasitémique, les parasites produisent des sialidases capables de cliver l'acide sialique à la surface des érythrocytes. Le système réticulo-endothélial séquestre alors ces globules rouges déficients, les élimine et cela est une première explication à l'anémie. Chez certaines espèces, comme les N'dama il existe une seconde couche d'acides sialique prenant le rôle de bouclier sur les globules rouges et protégeant leur intégrité. Cet atout constitue la première barrière contre l'anémie (Shugaba et al. 1994). Aujourd'hui, le marqueur de trypanotolérance reste le contrôle de l'anémie, évalué par le PCV, volume des cellules emballées.

Une revue répertorie un certain nombre d'indices et de pistes pour mieux comprendre ce phénomène. Les auteurs expliquent que chez le buffle africain, le contrôle de la parasitémie est dû à une diminution de l'activité catalase et une augmentation de l'activité peroxidase. De même, par une étude de croisement entre différents animaux, ils ont pu mettre en évidence que le contrôle de l'anémie n'était pas directement lié au contrôle de la parasitémie et qu'il y a au moins deux mécanismes évolutifs indépendants qui permettent une trypanotolérance (Naessens 2006).

Récemment une étude sur les Sheko (Mekonnen et al. 2019), identifie les variations géniques entre les espèces trypanotolérantes et trypanosensibles et les scientifiques ont mis en évidence certains gènes impliqués dans le développement et la prolifération des lymphocytes T et B, dans les anémies par déficit en fer (import) et dans les médiateurs de l'érythropoïèse (hsp70), tous pouvant jouer un rôle dans l'anémie. Les espèces trypanotolérantes auraient aussi la capacité de switcher de la réponse innée à la réponse adaptative plus rapidement par l'induction de macrophage de type M2.

Nous savons en résumé peu de choses sur ces espèces trypanotolérantes, mis à part le fait qu'elles ont été introduites il y a plus de 3000 ans sur le territoire africain, ce qui leur a permis de subir au fil des années une pression de sélection les rendant

aujourd'hui précieuses, à la fois pour comprendre les mécanismes génétiques et cellulaires sous-jacents mais aussi d'un point de vue économique car garder des troupeaux de pure race assure l'éleveur de la non souffrance et de la productivité de ses bêtes (Berthier et al. 2016).

2.2 Les interactions hôtes-parasites

2.2.1 Les facteurs de résistance génétiques contre les parasites

2.2.1.1 Généralités sur le facteur trypanolytique : TLF

Trypanosoma brucei brucei infecte un grand nombre de mammifères dont un certain nombre sont résistants au parasite. C'est le cas de certains primates et des humains. Très tôt les chercheurs se sont rendus compte que le sérum humain pouvait avoir une activité trypanolytique. Après quelques études de purification des protéines et lipides du sérum, ils ont mis en évidence que les HDL (High Density Lipoproteins) étaient responsables de la lyse de certaines sous-espèces de parasites. Un sérum exempt de HDL est un sérum inactif contre les trypanosomes. Le facteur trypanolytique est donc lié aux HDL (Rifkin 1978).

La compréhension structurale de ce facteur trypanolytique appelé TLF, a suscité un bon nombre d'études de grande envergure et ce n'est que bien plus tard que les scientifiques ont découvert la composition exacte de ce facteur. Le mécanisme d'action est cependant encore en étude à ce jour. Ce que nous pouvons cependant avancer aujourd'hui est que ce facteur trypanolytique est constitué de deux apolipoprotéines, APOA-1 (controversé) et APOL-1 et d'une HRP (Haptoglobine-Related Protein). L'ensemble de ces protéines forme des complexes, TLF-1 et TLF-2 (contient un complexe d'IGM) contenus dans le sérum de l'hôte et qui permet la résistance de ce dernier au parasite. Grâce à l'HRP, le TLF-1 entre par endocytose dans le trypanosome par l'intermédiaire du récepteur Hp-Hb (haptoglobine-hémoglobine) nommé TbHpHbR5 (Figure 16).

Il est difficile aujourd'hui de décrire l'endocytose du TLF-2 qui n'utiliserait apparemment pas de HRP (controversé).

Dans le parasite, l'APOL-1 gagne le lysosome et permet la formation de pores induisant une dérégulation osmotique conduisant à la lyse du parasite. Beaucoup d'auteurs ne sont pas d'accord sur son action exacte concernant une lyse ou une apoptose, mais tout porte à croire que l'élément principal de l'activité trypanolytique du sérum est l'APOL-1,

qui possède dans sa partie N-Terminale des motifs similaires à ceux impliqués dans la formation de pores membranaires par les toxines bactériennes de type colicines (Perez-Morga 2005). Ce mécanisme de défense est valable pour les sous-espèces de trypanosomes dont le système immunitaire humain peut se débarrasser. Cependant, certains parasites évadent ce système immunitaire de l'Homme. C'est le cas des deux pathogènes humains *Trypanosoma brucei rhodesiense* et *gambiense*.

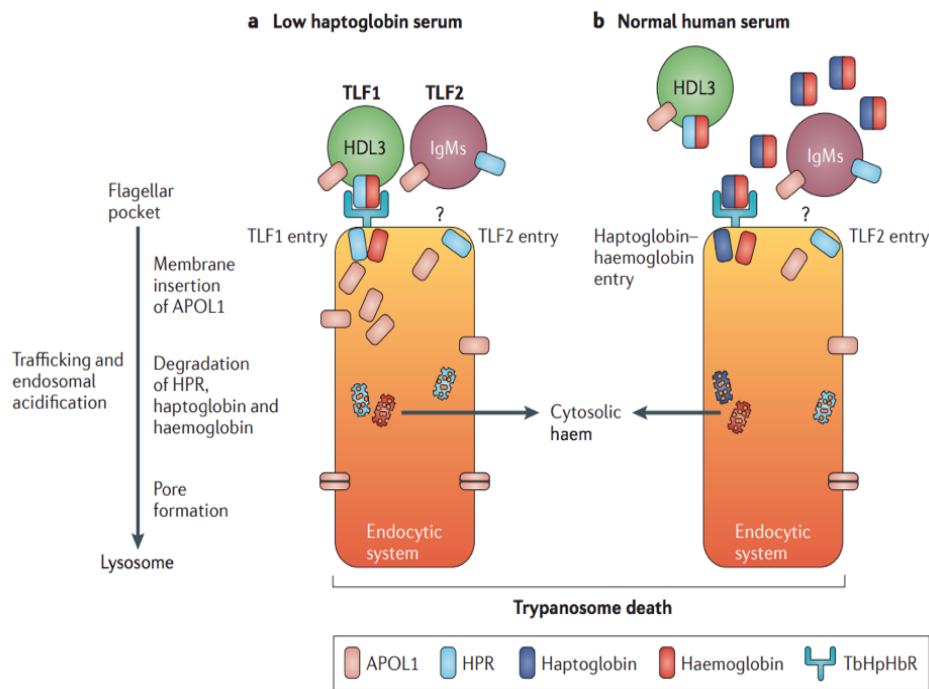


Figure 16 : Mécanisme général de l'endocytose des TLF

D'après (Pays et al. 2014) : L'APOL-1 contenue dans le TLF-1 et le TLF-2 entre dans le parasite et se fixe sur la membrane endosomale dès que le pH le permet entrainant la lyse parasitaire par un flux de chlore endolysosomal. Le taux d'haptoglobine dans le sang va déterminer la faculté du sérum à lyser le parasite. En effet, lors d'une action du TLF-1, l'HRP permettant de faire entrer l'APOL-1 entre en compétition avec l'haptoglobine. Si celle-ci est exprimée en quantité normale, cela suffit à inhiber l'action du TLF-1. Une haptoglobulinémie (a) permet l'entrée de l'APOL-1 et donc la lyse du parasite. En condition normale, c'est donc le TLF-2 qui aurait une activité supérieure au TLF-1 (b).

2.2.1.2 La résistance au TLF de *Trypanosoma brucei rhodesiense*

Trypanosoma brucei rhodesiense est résistant à l'action de l'APOL-1 par l'expression d'un variant spécifique du VSG qui se fixe à l'extrémité C-terminale de l'APOL-1 et qui empêche son entrée dans le lysosome. Cette protéine est appelée le SRA (Serum Resistance Associated protein) et contrairement aux particules de VSG classiques, elle s'accumule dans le système endolysosomal du parasite, interagit avec l'APOL-1 et empêche son action trypanolytique (Figure 17).

Il est intéressant de noter que le passage répété de ce parasite dans la souris lui fait perdre son activité de résistance vis à vis du sérum humain et qu'il regagne cet avantage quand la souris est transfusée avec du sérum humain (Pays et al. 2006). Cela confirme l'expression du variant spécifique du VSG que l'on appelle SRA.

Il a été prouvé que transférer le gène de résistance au sérum humain SRA, à une espèce normalement non pathogène pour l'Homme suffit à rendre le parasite contaminant (Van Xong et al. 1998). Il a été de plus suggéré que *Trypanosoma brucei brucei* et *Trypanosoma brucei rhodesiense* pouvaient se transférer de manière libre le gène de résistance au sérum humain SRA-1 ou SRA-2. Cependant cela n'a pas directement été observé, mais déduit à partir de données phylogénétiques (Balmer et al. 2011).

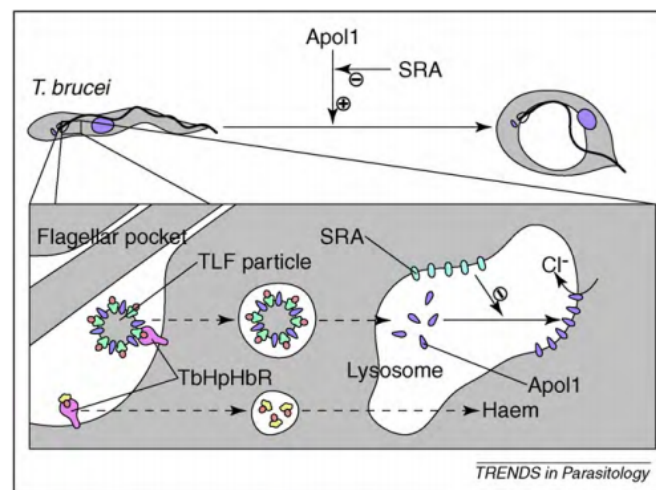


Figure 17 : Action trypanolytique sur le *Trypanosoma brucei brucei* et protection du SRA contre la lyse parasitaire

D'après (Wheeler 2010) : Le SRA, variant spécifique sécrété du VSG fixe l'APOL-1 de l'hôte afin d'empêcher la formation de pores dans le lysosome et l'afflux de Cl⁻, entraînant la lyse du parasite.

2.2.1.3 La résistance au TLF de *Trypanosoma brucei gambiense*

Le mécanisme de résistance de *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1 est multifactoriel. Il comprend : 1/Une capacité diminuée du TLF à se fixer sur le récepteur du parasite, c'est-à-dire une diminution de l'endocytose de l'APOL-1 par l'apparition d'une protéine TbHpHbr mutée (L210S) de moindre affinité. 2/L'expression d'une protéine de VSG mutée, la *T.b.gambiense specific glycoprotein* (TgsGP) qui modifie la rigidité de la membrane du trypanosome et une augmentation de la production de cystéines-protéases qui dégradent l'APOL-1 (Cathepsine L par exemple) (Cooper et al. 2016) (Figure 18).

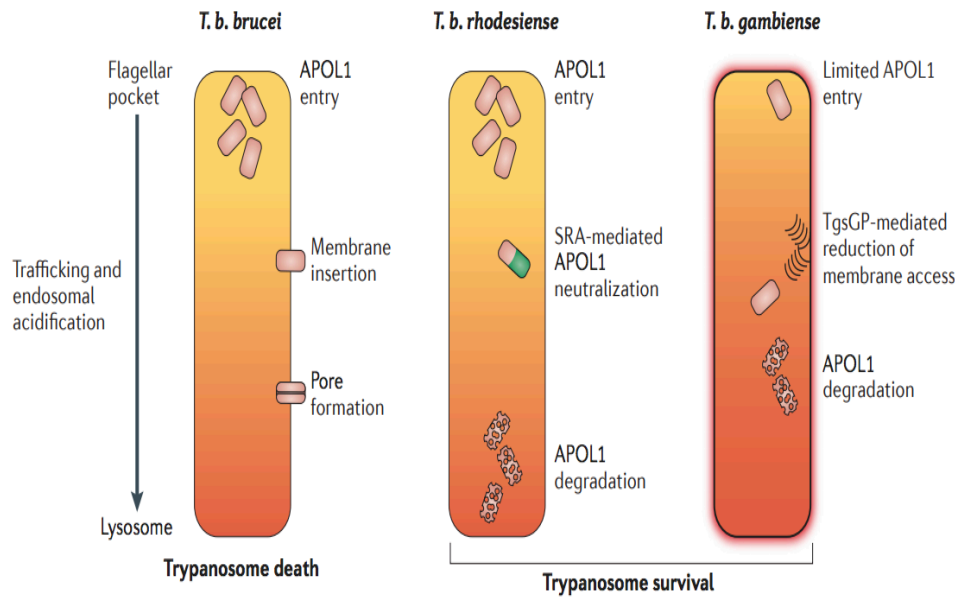


Figure 18 : Mécanisme général de la trypanolyse chez l'Homme

D'après (Pays et al. 2014) : L'entrée de l'APOL-1 humaine dans le parasite *Trypanosoma brucei brucei* induit la formation de pores et la lyse du parasite. La survie de certains trypanosomes tient pour *Trypanosoma brucei rhodesiense* dans sa faculté à sécréter un VSG, le SRA, qui s'accumule dans l'endolysosome et empêche l'APOL-1 de former des pores, et donc la lyse parasitaire. Pour *Trypanosoma brucei gambiense*, cela tient en une diminution de l'entrée de l'APOL1 au niveau de son récepteur membranaire spécifique. Une trop petite quantité d'APOL-1 ne peut induire la lyse parasitaire.

En présence d'un sérum mais en hypo-haptoglobulinémie, comme c'est le cas dans les régions touchées par le paludisme, la compétition sur le récepteur d'endocytose présent sur le parasite entre l'Hb et le TLF ne se fait plus. Une plus grande quantité d'APOL-1 peut alors entrer dans le parasite et le lyser (Uzureau et al. 2013) (Figure 19). Etre impaludé serait donc un facteur protecteur contre cette trypanosomiase.

Pour le groupe 2, il semblerait que sa capacité à endocyter le TLF soit comparable aux autres trypanosomes et bien supérieure au groupe 1. Un autre mécanisme, non encore élucidé, serait à l'origine de sa résistance au sérum humain (Capewell et al. 2011). Les patients parasités par le groupe 2 sont peu nombreux, essentiellement retrouvés en Afrique de l'ouest et certains chercheurs pensent qu'il s'agit d'un hybride entre le *Trypanosoma brucei brucei* et le *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 1. Le groupe 2 serait une zoonose, qui profiterait d'un affaiblissement du système immunitaire de l'hôte ou d'une co-infection pour parasiter l'hôte. Quoi qu'il en soit, ce cluster n'est pas le

plus représenté et sans être négligé, ne représente pas l'objectif numéro un de la lutte contre la trypanosomiase africaine (Jamonneau et al. 2019).

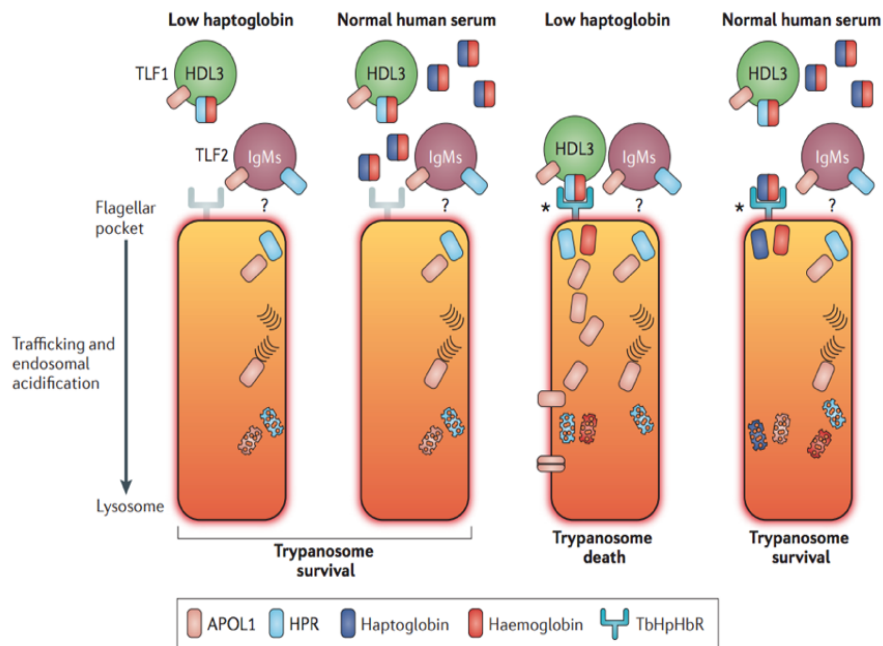


Figure 19 : L'hypo-haptoglobulinémie, facteur protecteur de trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense*

D'après (Pays et al. 2014) : La spécificité de *Trypanosoma brucei gambiense* est la modification de la protéine TbHpHbR permettant l'action du TLF-1. Donc le TLF-1 ne pourra plus lyser le parasite même en faible concentration d'haptoglobine. Lorsque l'on ré-exprime le récepteur natif du *Trypanosoma brucei brucei*, en hypo-haptoglobulinémie, on obtient de nouveau une lyse parasitaire.

2.2.1.4 Les mutations génétiques favorables

Une étude sur les maladies liées au rein a mis à jour une résistance génétique à *Trypanosoma brucei rhodesiense* en Afrique. En effet, certains américains d'origine africaine étaient plus touchés par certaines pathologies rénales que les américains d'origine européenne. Les chercheurs ont mis en évidence la présence d'une mutation au niveau de l'APOL-1 (variant G2) qui serait un facteur favorisant les maladies rénales mais aussi, pour ce qui nous concerne, une adaptation permettant au facteur trypanolytique de fonctionner et donc de se prémunir des trypanosomes (*Tbr*).

Ce facteur génétique a été hérité par le passé de leurs ancêtres africains constamment en présence de ce trypanosome particulier (Figure 20).

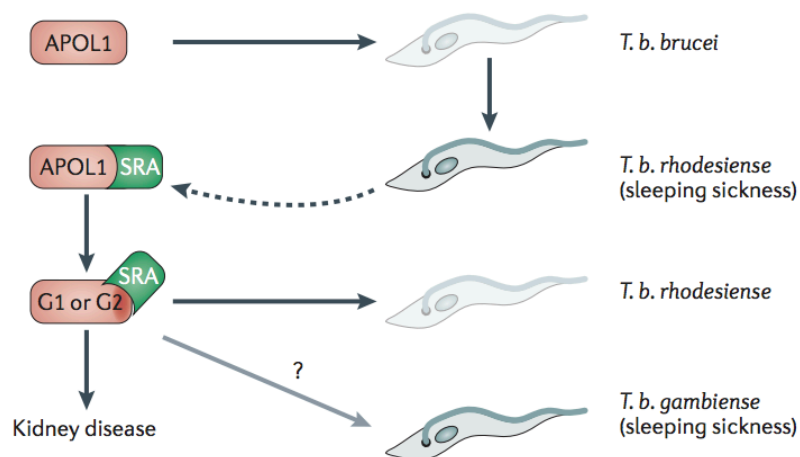


Figure 20 : Acquisition de facteurs évolutifs protecteurs contre le *Trypanosoma brucei rhodesiense*

D'après (Pays et al. 2014) : L'évolution des différents allèles codants l'APOL1 comme la G1 ou la G2, conduit les populations autochtones à résister à certains parasites. C'est ainsi que le SRA qui peut se fixer sur l'APOL1 va moins facilement se fixer sur les variant G1 et G2 et donc les personnes possédant ces variants vont lyser *Trypanosoma brucei rhodesiense*. En contrepartie, ces variants amènent les populations à avoir des maladies rénales. Un mutant de *Trypanosoma brucei brucei* résistant à ces deux variants pourrait ainsi avoir vu le jour : *Trypanosoma brucei gambiense*.

L'épidémiologie de répartition du parasite trouverait ici un début d'explication : la distribution de ce parasite à l'Afrique de l'est pourrait s'expliquer par une résistance des humains de l'Afrique de l'ouest au *Trypanosoma brucei rhodesiense*, par l'acquisition d'une APOL-1 sur laquelle le SRA ne peut pas se fixer et qui donc peut entrer dans le trypanosome et le lyser. Cette mutation si elle est hétérozygote, pourrait être profitable en cas de contamination par le trypanosome africain, mais si elle est homozygote, serait délétère concernant les pathologies rénales (Genovese et al. 2010).

Contrairement à cet effet protecteur concernant *Trypanosoma brucei rhodesiense*, la présence du variant G2 lors d'une affection à *Trypanosoma brucei gambiense* entraînerait un accroissement de la symptomatologie liée au parasite. Il existe un autre variant de l'APOL-1, le variant G1 qui permet une évolution asymptomatique des hôtes contaminés par *Trypanosoma brucei gambiense*. La maladie est donc latente et le dépistage compliqué (Cooper et al. 2017, 1). Concernant *Trypanosoma brucei rhodesiense*, il est important de noter que les babouins notamment y sont résistants.

Cette information est connue des scientifiques depuis de nombreuses années mais n'a été expliquée que bien plus tard, en 2009, par la découverte de deux lysines modifiant l'APOL-1 et empêchant la fixation au SRA. L'APOL-1 redevient effective et le

trypanosome inoffensif (Thomson et al. 2009). Le sang des babouins aurait une activité trypanolytique 10 à 25 fois supérieure à celle de l'Homme.

2.2.1.5 Les mutations génétiques défavorables

Certains patients atteints de la maladie de Tangier ou analphalipoprotéïnémie, caractérisée par une disparition quasiment complète des HDL, ne sont plus résistants aux trypanosomes normalement lysés par le sérum humain (Rifkin 1978). Cette observation a permis d'argumenter la présence du TLF dans les HDL, plus particulièrement les HDL3. Cette hypothèse a ensuite été contredite par une autre équipe (Tomlinson et al. 1995) mais finalement, les chercheurs ont fini par prouver que l'APOL-1, constituant des HDL, était trypanolytique.

2.2.1.6 La coévolution du facteur avec l'hôte

Pour être actif, le SRA se fixe sur l'APOL-1 empêchant son activité trypanolytique. Cette fixation pour les APOL-1 des humains est dépendante du pH, ce qui explique une variation dans l'activité trypanolytique. L'APOL-1 du babouin quant à elle, n'est pas dépendante du pH ce qui lui confère une activité trypanolytique constante.

Le variant G2 de l'APOL-1 a probablement précédé le variant G1 en réponse à l'apparition du facteur SRA. Il y a environ 10 000 ans, l'apparition de l'allèle G2 a permis aux humains contaminés par le trypanosome africain de survivre et donc de répandre ce caractère protecteur, favorisant la disparition au niveau local de ce parasite. En contrepartie, la sélection naturelle a fait apparaître un autre trypanosome, le *Trypanosoma brucei gambiense*, qui lui, est résistant à cet allèle (Pays et al. 2014).

Les auteurs supposent que la présence de l'allèle G1 en grande majorité en Afrique de l'ouest pourrait être un avantage plus tardif, pour lutter contre d'autres pathologies, par exemple *Trypanosoma brucei gambiense* groupe 2 ou certaines leishmanioses.

L'APOL-1 de l'Homme moderne est phylogénétiquement plus proche de celui des Néandertaliens et des Denisoviens que des autres ancêtres humains. L'explication de la conservation de cet allèle est plutôt due, selon les scientifiques à un croisement entre les différents hominidés après leur sortie d'Afrique, plutôt qu'à une sélection positive de l'allèle des Hommes qui avaient migré vers l'Eurasie (Thomson et al. 2014).

Comme certains chercheurs ont montré que certains animaux, notamment les babouins comme *Papio anubis*, sont résistants à l'infection par *Trypanosoma brucei rhodesiense*, une équipe a voulu trouver des animaux capables de résister à *Trypanosoma brucei gambiense*. Aucun des primates testés n'était résistant à ce parasite excepté le *Papio papio* qui possède une activité lytique sur toutes les souches de trypanosomes pouvant infecter l'Homme. Une information intéressante concernant cette étude porte sur la différence entre le groupe 1 et le groupe 2 de *Trypanosoma brucei gambiense*. En effet, les chercheurs ont observé une diminution de la sensibilité à l'APOL-1 du *papio* avec les deux groupes de *Trypanosoma brucei gambiense*. Pour eux, cela venait d'une diminution de l'import du TLF dans le parasite. Cependant, quand on restaure l'import classique de l'APOL-1 c'est à dire qu'on rétablit un récepteur HpHbr non *gambiense*, le groupe 1 redevient aussi sensible à l'APOL-1 que les autres *Trypanosoma brucei*. Ceci n'est pas le cas pour le groupe 2 qui possède donc un mécanisme de résistance différent et plus direct concernant l'APOL-1 (Cooper et al. 2016), non dépendant du récepteur HpHbr.

2.2.2 Les actions du système immunitaire

La première action du système immunitaire est l'apparition, après la piqûre par l'insecte contaminant, du ganglion de Winterbottom. Le ganglion gonfle pour contenir les parasites qui réussissent cependant à passer dans le sang aux alentours du 5^{ème} jour. Une réponse type IgM est enclenchée par l'organisme et l'activation du complément permet le recrutement, par l'intermédiaire de dérivés solubles, de polynucléaires neutrophiles, de monocytes et de macrophages.

Lors de l'évolution de la trypanosomiase africaine, le système immunitaire est surstimulé par les vagues parasitaires engendrées par le remodelage du VSG. Les macrophages activés précocement (TLR9) par la présence du parasite, vont libérer de grandes quantités de TNF- α et d'IFN- α/β . Une production toujours croissante de TNF- α induit la perméabilité des vaisseaux au niveau du SNC. En effet, dans le but de lutter contre le parasite, la production de TNF- α permet l'expression de molécules d'adhésions (ICAM/VCAM) qui facilitent la fixation des Lymphocytes T (LT) sur les cellules endothéliales. La pénétration des LT, notamment Th1 à travers la BHE est induite par la libération d'IFN- α/β qui permet la production d'une quantité limitée de CXCL10 et l'entrée des LT dans l'espace péri-vasculaire. Mais cela entraîne aussi, en parallèle, l'entrée des parasites à travers les jonctions. Les antigènes de parasites reconnus par les

macrophages sont présentés aux LT qui vont induire la libération de l'IFN- γ . Cela accentue le processus d'inflammation et ouvre la membrane basale du parenchyme permettant un afflux de LT et de trypanosomes dans le parenchyme cérébral.

Cependant, une étude montre que si l'IFN- γ n'est pas présent dans les souris, la parasitémie est plus élevée, mais une trop grande quantité d'IFN- γ a le même effet que le TNF- α . Il semble qu'il n'y ait donc pas de contreparties possible, le système immunitaire est essentiel pour protéger l'hôte de l'afflux croissant de parasites mais c'est aussi lui qui entraîne l'évolution en phase terminale de la trypanosomiase africaine (Masocha et Kristensson 2012). Il a été par ailleurs démontré un switch de la réponse immunitaire de type I vers un type II au niveau sanguin, régulant l'inflammation primaire, tandis que la présence de IFN- γ et TNF- α (provenant des astrocytes activés) dans le SNC augmente toujours plus durant l'évolution de la maladie conduisant à une inflammation se traduisant sous la forme d'une méningoencéphalite. La présence de cytokines telles que les IL-10 et IL-6, à l'action immunomodulatrice, a été mise en évidence dans le stade cérébral de la pathologie quand l'inflammation était contrôlée et au plus bas. Il y a donc une balance très difficile à équilibrer entre ces cytokines et qui explique le rôle protecteur des IL-6 et IL10 vis-à-vis de la méningite, et le rôle fondamental du TNF- α et de l'IFN- γ pour contrôler la parasitémie (Sternberg et al. 2005).

La réponse immunitaire majoritairement à base d'IgM, retrouvées en très grande quantité dans le sang des malades et correspondant à chaque fois à la réponse à un pic parasitémique induit par la multiplicité de VSG n'est donc pas efficace. Ainsi le système s'épuise à utiliser une réponse non adaptée et très peu protectrice. La variation antigénique systématique de ces parasites rend d'ailleurs la mise au point d'un vaccin très compliquée dans l'état actuel des connaissances scientifiques. L'organisme devient immuno-déficient à l'égard des nombreux autres pathogènes. Cette sur-activation du système immunitaire induit la présentation de molécules du soi par les cellules présentatrices d'antigène et l'apparition de réactions auto-immunes. Des phénomènes de CIVD plus couramment rencontrés lors d'une infection par *Trypanosoma brucei rhodesiense* ont également été observés (Courtioux 2005).

En résumé, le passage du parasite vers les tissus à travers l'endothélium des vaisseaux est un phénomène multifactoriel dans lequel entrent en jeu plusieurs protéines et substances telles que le NO, le TNF- α , l'IFN- γ et certaines métalloprotéinases comme les

« host's matrix metalloproteinases (MMP) » ou les protéases majeures de surface (MSP) (Moreno et al. 2019). Ce processus complexe est encore en cours d'étude, dans le but de dépister au plus tôt le passage de la BHE par le parasite et l'évolution vers le stade 2 de la maladie.

2.3 Les moyens de lutte

2.3.1 Les différentes épidémies

Le parasite peut se transmettre par piqure d'un insecte vecteur, par voie transplacentaire ou par voie sexuelle (quelques cas rapportés) (Rocha et al. 2004). Il y a eu en tout 3 grandes épidémies recensées selon l'OMS :

- La première a eu lieu entre 1885 et 1906, principalement en Ouganda et dans le bassin du Congo au confluent des fleuves Oubangui et Zaïre jusqu'au lac Victoria. Cette épidémie tua environ 500 000 personnes.
- La deuxième commença en Afrique centrale en 1920 et a touché un grand nombre de pays africains. C'est au cours de cette épidémie que les équipes mobiles luttant contre la maladie du sommeil ont été créées.
- La troisième entre 1970 et la fin des années 1990, fut en partie causée par une désorganisation administrative et politique, l'activité humaine de déforestation et la culture intensive. Cela a créé un déséquilibre entraînant une recrudescence de la maladie liée à l'installation de populations de glossines.

Aujourd'hui, moins de 1000 cas sont déclarés chaque année (977 cas recensés en 2018) mais 65 millions d'humains sont exposés au risque de contracter la maladie. Dix millions de km² en Afrique sub-Saharienne sont affectés, soit environ 1/3 de la surface des terres du continent. Concernant la Nagana, l'impact est colossal avec 60 millions de bêtes à risque, soit environ 5 milliards de dollars. Les foyers où la trypanosomiase persiste et sont des régions d'Afrique où la vigilance est accrue. Ils sont en concordance avec la présence des glossines (Figure 21).

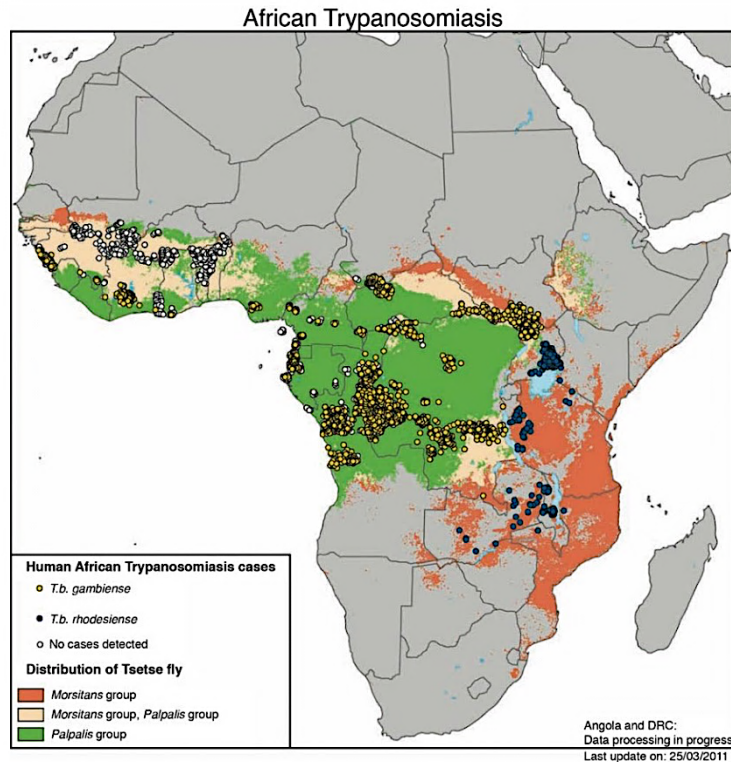


Figure 21 : Répartition des glossines vectrices de trypanosomiase humaine et cas déclarés de maladie du sommeil

D'après *Atlas of human infectious disease, Wiley & Blasckwell 2012* : La répartition des tsétsés, vectrices de trypanosomiase africaine est le reflet de la carte des cas ci-dessus. On observe une répartition à l'est de *Trypanosoma brucei rhodesiense*, lieu dépourvu des allèles protectrices non-affines pour le SRA, et à l'ouest et au centre le *Trypanosoma brucei gambiense*. Le nombre de cas est peu élevé mais la surface de répartition est très grande et difficilement contrôlable, tant au niveau épidémiologique qu'au niveau du suivi à la fois des vecteurs mais aussi des personnes contaminées.

2.3.2 Le dépistage de la maladie

Le dépistage de la trypanosomiase africaine peut se faire à chacun des stades. La mise en évidence de la contamination n'est pas identique si le patient est infecté par *Trypanosoma brucei gambiense* ou *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Dans les deux cas, la symptomatologie et l'apparition du signe de Winterbottom ou ganglion cervical enflé, sont importantes pour orienter le dépistage sur les personnes cibles. Le dépistage s'effectue de différentes manières : grâce à des tests sérologiques, la détection du parasite dans les liquides biologiques, la recherche de son ADN dans le sang du patient (PCR et LAMP) ou par immunofluorescence. Les tests sérologiques sont disponibles uniquement pour le *Trypanosoma brucei gambiense* (détection d'anticorps anti-VSG).

De manière schématique, la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei rhodesiense* est une affection aiguë dans laquelle on retrouve la présence d'une grande quantité de trypanosomes dans le sang, la plupart du temps jusqu'à 10 000 parasites / mL. Il est donc relativement simple d'effectuer un diagnostic parasitologique direct en observant le parasite par ponction du ganglion de Winterbottom ou sur un frottis sanguin. Aucun test n'est utilisable pour la détection des VSG de *Tbr*.

Pour *Trypanosoma brucei gambiense*, la production abondante d'IgM et d'IgG par l'hôte contre certaines protéines comme le VSG peut être recherchée. Un test (SD BIOLINE HAT) très spécifique et très sensible existe ciblant les antigènes de VSG connus des souches LiTat1.3 et 1.5. Il n'est cependant effectif que 3 à 4 semaines après la contamination.

Pour le dépistage de masse, un test d'agglutination rapide est utilisé, le CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis). Ce test a une sensibilité d'environ 91%. Les tests ELISA nécessitent hélas la présence d'un laboratoire et les tests de trypanolyse ne sont accessibles que dans les laboratoires de référence.

Certains patients atteints de la maladie du sommeil, positivent des tests de diagnostic rapide utilisés pour détecter le VIH ou le paludisme par exemple, diminuant ainsi leur spécificité. Certains chercheurs pensent que le diagnostic pourrait s'appuyer sur le taux d'IgM cérébraux, le taux de néoptérine (Tiberti et al. 2012), qui a déjà été utilisé pour d'autres pathologies, ou d'autres protéines spécifiques par exemple.

Cependant, certaines études de terrain montrent que pour des patients apparemment sains, un certain nombre de parasites seraient retrouvés dans la peau, demeurant un réservoir privilégié pour la survie du parasite. Cette découverte remet en question l'éradication de la maladie, car la présence du parasite dans la peau laisse un potentiel réservoir actif de parasite qu'il est très difficile de dépister et donc de soigner et qui permettrait une transmission silencieuse de la trypanosomiase (Capewell et al. s. d.).

De plus, il semblerait qu'à l'endroit du chancre, où une réserve de parasite persiste, la chaleur de la peau est augmentée et favoriserait la piqûre au niveau de l'endroit infecté par de nouvelles glossines, entraînant une propagation plus efficace de la maladie (Camara et al. 2020).

2.3.3 Les éléments à prendre en compte dans la gestion de la trypanosomiase africaine

Plusieurs scientifiques sont alarmés aujourd'hui par les discours très optimistes que peuvent énoncer certains épidémiologistes, attestant que la maladie du sommeil sera éliminée pour 2030. En effet, au vu du nombre très restreint de nouveaux cas, on peut se demander s'il ne faut pas effectivement concentrer les efforts de lutte sur d'autres maladies dont le taux d'incidence et surtout de mortalité sont plus élevés.

Néanmoins, cette situation s'est déjà produite au cours du dernier siècle et la maladie ayant été considérée comme éradiquée, la vigilance et la veille ont disparu. Cette légèreté par rapport à une maladie vectorielle n'a pas été sans conséquences, car quelques années après, une nouvelle épidémie a vu le jour. Il faut en effet comprendre que l'éradication d'une telle maladie met en jeu la gestion de nombreux facteurs que nous ne pouvons hélas pas toujours contrôler. Un modèle des différents éléments à prendre en considération a été réalisé par des épidémiologistes de terrain (Rutto et al. 2013) (Figure 22).

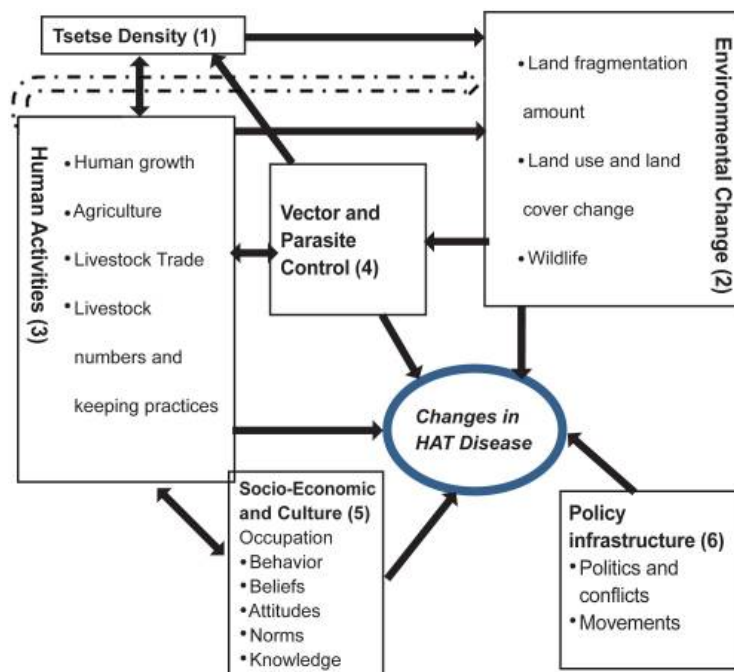


Figure 22 : Relation étroite entre l'environnement et l'activité humaine, permettant la compréhension de la complexité de l'éradication de la trypanosomiase africaine

D'après (Rutto et al. 2013), détaillé dans le paragraphe 2.3.3 de ce document.

Ce modèle multifactoriel met en lumière l'intrication entre :

- Les activités humaines avec la déforestation, la culture intensive, l'accroissement et les mouvements de populations.
- L'activité des tsé-tsé qui en découle, avec une adaptation à de nouveaux environnements, leur multiplication selon les habitats.
- L'adaptation des trypanosomes, avec des évolutions génétiques, l'adaptation à de nouveaux vecteurs, de nouveaux hôtes, la virulence.
- Les conditions socio-politiques, avec une sensibilisation de la population, la mise en place de mesures envers les tsé-tsé.
- Les conditions environnementales avec l'utilisation d'insecticides moins agressifs pour la biodiversité, multipliant les insectes et par la même de nouveaux vecteurs disponibles pour transmettre la maladie.

2.3.4 La prophylaxie

2.3.4.1 Les idées d'autrefois

Depuis la découverte du parasite, les Hommes ont cherché des moyens pour lutter contre la propagation de la maladie. En effet, les vagues des différentes épidémies, ont amené l'Homme à penser des stratégies de soin et d'élimination jusqu'alors peu envisagées. C'est ainsi que l'on peut retrouver un article français datant de 1973 et faisant état des connaissances et des moyens de lutte à mettre en place à l'époque. Déjà, on voyait différents axes qui sont encore aujourd'hui en application. Les scientifiques voulaient mettre en place des études géographiques et climatiques pour déterminer les différents foyers, un dépistage strict, exhaustif et avec contrôle régulier des anciens malades, des traitements innovants et sans effets indésirables, une campagne de lutte contre les glossines et une chimio-prophylaxie.

L'axe majeur de lutte avait déjà pour cible les glossines car on comprend bien qu'éradiquer le vecteur du parasite permet de stopper l'incidence de nouveaux cas. Pour cela, de larges épandages d'insecticides par hélicoptère et rampes de pulvérisation étaient employés (dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) et dieldrine). Ces épandages sont des mesures toujours en vigueur aujourd'hui dans certaines régions et surtout dans les grandes villes.

Les organochlorés sont cependant très toxiques pour les vertébrés et très rémanents. Ils sont un frein non négligeable à la biodiversité. En 1973, les scientifiques pensaient les remplacer contre les organophosphorés et les pyréthroïdes, ce qui fut le cas.

La technique du mâle stérile était en projet, et consistait à introduire des glossines mâles rendues stériles par rayonnement UV incapables de fertiliser les femelles qui ne pouvaient donc plus produire de larve, favorisant l'extinction de l'espèce.

La chimio-prophylaxie consistait en la Lomidinisation (Frézil et al. 1981), c'est-à-dire l'injection préventive de lomidine en IM lente et faisait déjà partie de l'arsenal de lutte en 1949 (Figure 23). En 1971, cependant, des souches se sont révélées insensibles aux diamidines et dans un souci de conserver l'activité des molécules à disposition et de ne pas favoriser la résistance croisée avec les arsenico, cette chimioprophylaxie a été stoppée (Ricosse et al 1973). De plus, malgré les dires de cette étude, de nombreuses personnes auraient eu de graves effets indésirables à l'injection des diamidines, notamment car ces injections n'étaient pas effectuées dans des conditions stériles (Lachenal 2014).

Tous ces axes sont aujourd'hui encore au fondement des projets actuels de lutte pour l'extinction de la trypanosomiase africaine.



Figure 23 : Les habitants d'un village africain, examinés pour être testés et lomidinisés

2.3.4.2 La prophylaxie actuelle

A ces anciennes mesures se rajoute par exemple aujourd'hui le projet d'infection des mouches par des micro-organismes. Cette technique fut utilisée pour la mouche noire avec *Bacillus thuringiensis israelensis* mais n'a pas été testée sur les glossines. Malgré un franc succès dans l'éradication de certains vecteurs avec la technique du mâle stérile, cette stratégie est très couteuse et très compliquée à mettre en place en Afrique, dû à l'étendue géographique couverte par les tsé-tsé et le nombre d'années de suivi indispensables à la réussite du projet. A Zanzibar, complètement isolée du reste de l'Afrique, l'éradication par cette technique a été totale (Vreysen et al. 2000). Au Nigéria au contraire, malgré un franc succès au départ, le manque de moyens a conduit à la recolonisation par les tsé-tsé (Odeniran et al. 2018). Dans la même étude, les scientifiques expliquent que des stratégies de croisement des bêtes d'élevage avec les animaux trypanotolérants ont été testées, mais qu'au bout d'un certain temps, les souches d'animaux qui étaient à la base trypanotolérants, perdent ces capacités. Aujourd'hui la première stratégie est de limiter les contacts entre le vecteur et l'hôte de manière individuelle, que ce soit un Homme ou un animal. Plusieurs mesures peuvent être citées : Garder les portes fermées ou imprégnées de deltaméthrine par exemple, assécher les points d'eau et s'appliquer des produits insecticides. De manière plus générale, mettre en place des pièges à glossine (Figure 24), pulvériser des insecticides sur les jambes et le ventre du bétail ou sur le sol, mais cela pose un problème écologique dû à la destruction de la biodiversité (Esterhuizen 2015).



Figure 24 : Exemple de pièges à glossines

Photo M. Desquesnes, Cirad : Ces pièges à glossines sont au milieu d'un champ ou pâturent des bœufs dont l'aspect physique montre une atteinte par la Nagana. Piège Vavoua à gauche et piège biconique à droite.

2.3.5 Les traitements existants

2.3.5.1 La prise en charge thérapeutique humaine

La prise en charge thérapeutique se définit comme indiqué dans la (Figure 25) :

- Phase lymphatico-sanguine : Pentamidine pour la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense* et Suramine pour la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei rhodesiense*.
- Phase méningo-encéphalitique : Mélarsoprol en première ligne de *Trypanosoma brucei rhodesiense* et en deuxième ligne de *Trypanosoma brucei gambiense*. Eflornithine contre *Trypanosoma brucei gambiense* seulement. Nifurtimox et éflornithine contre la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense*.
- Le fexinidazole peut être utilisé dans les deux stades de la trypanosomiase à *Trypanosoma brucei gambiense*.

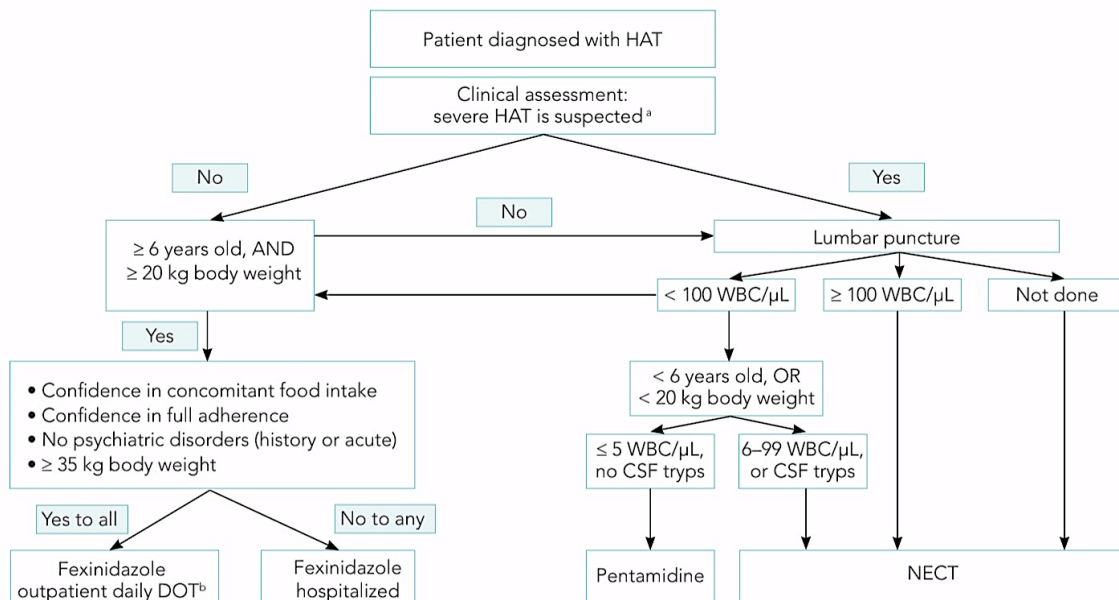


Figure 25 : Organigramme décisionnel de prise en charge de la maladie du sommeil

D'après les guidances de l'OMS 2019 : On observe qu'en cas de trypanosomiase sévère, le Fexinidazole n'est pas encore en première ligne. Il peut cependant être utilisé si rechute après traitement au NECT.

Les traitements développés au cours du dernier siècle sont encore aujourd'hui utilisés. L'utilisation du mélarsoprol, dérivé arsenico n'est plus privilégié et ce dernier tend à être remplacé par le fexinidazole, dernière molécule mise sur le marché par Sanofi et efficace même en stade II d'une maladie du sommeil à *Trypanosoma brucei rhodesiense* (Torreele et al. 2010).

2.3.5.2 Quelques données vétérinaires

Il est certain qu'aujourd'hui, la prise en charge vétérinaire de la trypanosomiase animale est très complexe (Figure 26). De nombreux médicaments circulent au marché noir et malgré le coût relativement bas d'une thérapie pour un animal unique, le traitement est risqué. Il provoque en règle générale une clairance rapide du parasite mais l'animal met beaucoup de temps à se remettre de la maladie et de la thérapie. De plus, il ne peut pas être consommé immédiatement et un temps de latence est nécessaire.

Médicament	Indication	Année de première utilisation	Structure [Demi vie]	Commentaires
Arsenicaux				
Atoxyl	Stade 1 <i>T.b.g.</i> *	1905	Pentavalent [?]	Atrophie du nerf optique
Tryparsamide	Stade 1 & 2 <i>T.b.g.</i>	1921	Pentavalent [2 jours]	Atrophie du nerf optique
Orsanine	Stade 2 <i>T.b.g.</i>	1925	Isomère du Stovarsol	
Melarsen	Stade 1 & 2 <i>T.b.g.</i>	1939	Pentavalent [?]	
Melarsen-oxyde	Stade 1 & 2 <i>T.b.g.</i> & <i>T.b.r.</i> **	1941	Trivalent [?]	
Melarsoprol (Mel B)	Stade 2 <i>T.b.g.</i> & <i>T.b.r.</i>	1949	Trivalent [35 heures]	Accroissement du taux de rechutes
Non-arsenicaux				
Suramin sodium	Stade 1 (<i>T.b.g.</i>)/ <i>T.b.r.</i>	début années 20	Naphtylamine polysulphonés [50 jours] (1 étude)	
Pentamidine isethionate	Stade 1 <i>T.b.g.</i>	1940	Diamidine aromatique [9.4 heures après IM] [6.4 heures après IV]	
Nifurtimox	Stade 2 <i>T.b.g.</i> (<i>T.b.r.</i>)	1977	5'-nitrofurane [3.5 heures]	Pas d'indication officielle pour la THA Effets secondaires et action sur <i>T.b.r.</i> peu documentés
Eflornithine	Stade 2 <i>T.b.g.</i>	1981	DL- α -difluorométhylornithine [3 heures]	

**T.b.g.* = *Trypanosoma brucei gambiense* ** *T.b.r.* = *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Figure 26 : Médicaments utilisés dans la prise en charge de la trypanosomiase africaine animale
D'après (Ollivier et Legros 2001)

A l'heure actuelle, certains médicaments sont couramment utilisés mais les chercheurs voudraient mettre en place une prise en charge plus appropriée concernant le mode d'administration et la toxicité. Chaque année, 35 millions de doses de trypanocides animaux sont délivrées seulement en Afrique Sub-Saharienne, et ce chiffre, si l'on considère le marché informel, devrait être au moins doublé (GIORDANI et al. 2016). L'enjeu est d'autant plus important que la répartition des parasites infectant a une distribution quasiment mondiale (Figure 27). Il est intéressant de noter que *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma vivax* sont moins sensibles aux diminazene et au mélarsoprol car ils ne possèdent pas le gène *AT1* et donc le transporteur P2 ni le AQP2, indispensables à l'entrée de telles molécules dans le parasite. En contre-partie,

l'ascofuranone, inhibiteur de TAO est plus efficace car il entraîne une accumulation toxique de glycérol dans le parasite (Fairlamb et Horn 2018).

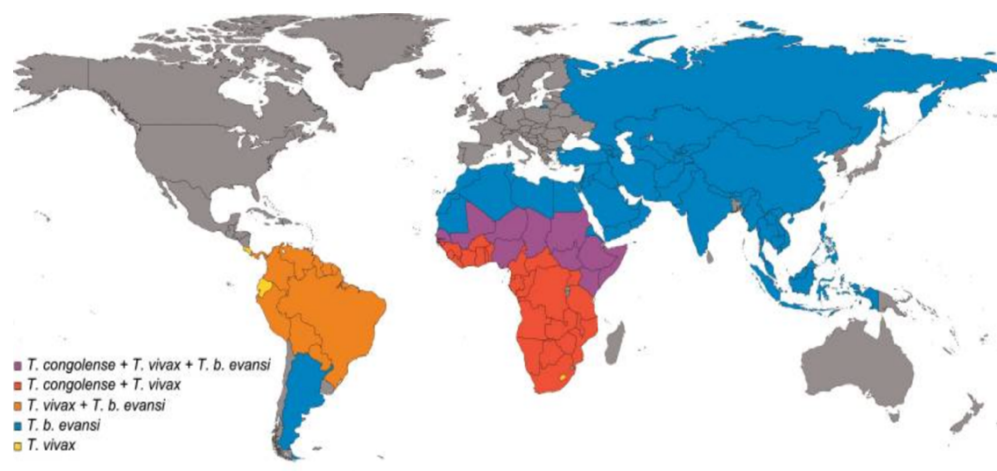


Figure 27 : Répartition des trypanosomes capables de provoquer une trypanosomiase animale chez les hôtes mammifères
D'après (GIORDANI et al. 2016)

2.3.6 Les mesures mondiales portées par l'OMS

L'OMS s'engage à fournir gratuitement en partenariat avec des laboratoires privés, les traitements humains nécessaires à la prise en charge de la trypanosomiase humaine africaine jusqu'à son élimination. La disparition de la THA est prévue pour 2030 (Figure 28).

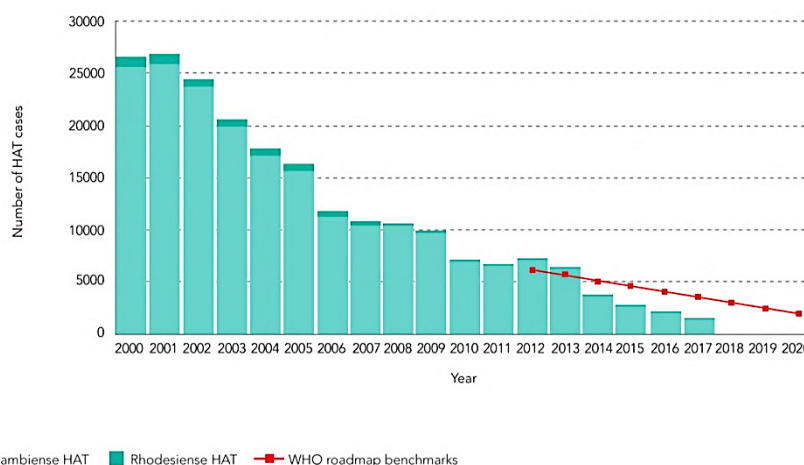


Figure 28 : Evolution du nombre de cas de maladie du sommeil sur les 20 dernières années
D'après les Guidances de L'OMS de 2019 : On observe une diminution radicale du nombre de cas ces 20 dernières années avec pour objectif l'éradication de la trypanosomiase africaine pour 2030.

3 Généralités sur les lipides

3.1 Qu'est-ce qu'un lipide ?

Les lipides sont des structures carbonées caractérisées par leur propriété physique de solubilité. Ils sont en effet peu ou pas solubles dans l'eau mais par contre solubles dans les solvants organiques non polaires. Il existe deux grandes catégories de lipides :

- Apolaire : on dit aussi que ce sont des lipides neutres.
- Amphiphiles ou bipolaires : ils possèdent une tête polaire liée à une queue apolaire (chaîne de carbone) qui leur confère une certaine solubilité dans l'eau.

On classe les lipides en différents groupes :

- **Les lipides vrais** : ces lipides sont le résultat de la condensation d'acides gras avec des alcools par liaison ester ou amide. Ils peuvent être simples comme les glycérolipides, les cérides ou les stérides ou complexes s'ils sont couplés à du phosphore (phospholipides), de l'azote, du soufre ou des oses.
- **Les lipoïdes** : les isoprénoïdes et les ecosanoïdes par exemple sont des composés qui possèdent les mêmes propriétés de solubilité que les composés lipidiques mais sont dépourvus d'acide gras.
- **Les lipides conjugués** : les lipides peuvent rentrer dans la composition de supramolécules et être associés aux protéines de manière le plus souvent non covalente, mais qui peut être covalente.

Les lipides peuvent avoir différents rôles biologiques, souvent indispensables. Ils peuvent servir de réserves énergétiques pour les cellules, participer à la structuration cellulaire, en entrant dans la composition des membranes plasmiques des cellules par exemple. Ils peuvent aussi être des précurseurs d'activité biologique, c'est-à-dire des médiateurs extracellulaires, des messagers intracellulaires ou composer les hormones stéroïdes et même certaines vitamines. Les lipides sont hydrolysés par des enzymes spécifiques que l'on appelle les lipases.

3.2 Qu'est-ce qu'une lipase ?

Les lipases font parties d'une famille hétérogène d'enzymes capables d'hydrolyser des triglycérides en acides gras et glycérol. La première fois qu'elles ont été mises en évidence fut dans le monde bactérien en 1901 chez le tristement célèbre *Pseudomonas aeruginosa* (Fickers, Destain, et Thonart 2008). Les lipases sont une sous-classe

d'enzymes spécialisées, dont il faut que je détaille en bref la généalogie. Les lipases font en premier lieu partie de la famille des α/β hydrolases.

3.2.1 Les α/β hydrolases

Les α/β hydrolases sont des enzymes dont la structure canonique repose sur l'association de 8 feuillets β connectés par 6 hélices α (Ollis et al. 1992). Malgré une structure primaire identique, l'association de ces constituants induit une grande variabilité de structure et de spécificité de substrat (Nardini et Dijkstra 1999). Certains éléments doivent pourtant rester très conservés, comme l'hélice αC , car elle joue un rôle clef dans le positionnement du « coude nucléophile » nécessaire à l'activité du site catalytique de l'enzyme (Figure 29).

La sérine catalytique est toujours présente au niveau du coude nucléophile situé à l'extrémité C-term du 5ème brin β , suivi d'une hélice α . Les protéines à repliement α/β hydrolases ont une activité d'hydrolyse, elles mettent en jeu une molécule d'eau. Elles font partie de la classification EC.3 (Enzyme Commission)(Fleischmann 2004). Si l'on rentre dans le détail, l'activité enzymatique a lieu plus précisément au niveau du « coude nucléophile ». Ce dernier est toujours composé par une séquence particulière : Sm-X-Nu-X-Sm (Sm : small residu, X : any residu, Nu= Nucléophile). Le nucléophile attaque le substrat pour former un acyl intermédiaire qui sera ensuite attaqué à son tour par la molécule d'eau.

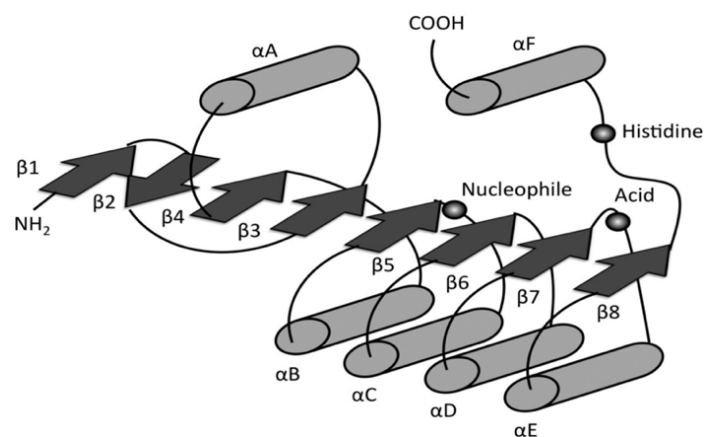


Figure 29 : Structure canonique des α/β hydrolases

D'après (Nardini et Dijkstra 1999)

Les flèches noires représentent les feuillets β , reliés entre eux par les hélices α , tubes gris.

3.2.2 Les estérases

Les estérases sont classifiées en tant que EC 3.1. Elles hydrolysent un acide au niveau de la liaison ester selon la réaction présentée dans la Figure 30.

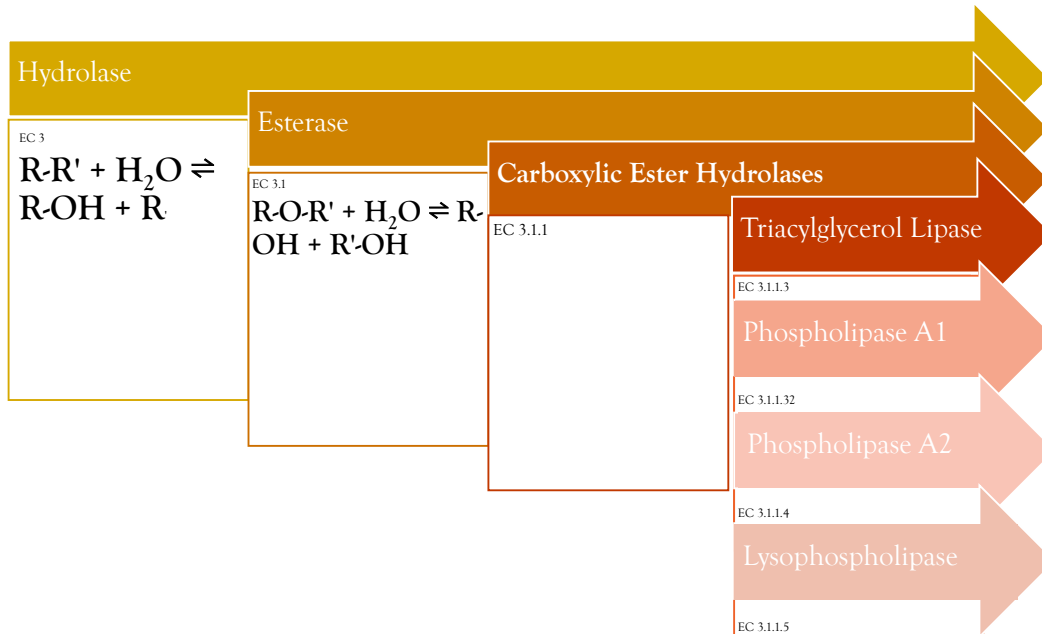


Figure 30 : Classification des Enzymes (EC) selon leur mode d'action.

3.2.3 Les lipases

3.2.3.1 Le détail du site actif

Les lipases ou triacylglycérol ester hydrolases, EC.3.1.1.3 sont des enzymes hydrosolubles dont la propriété est d'hydrolyser les ponts esters de substrats non solubles dans l'eau (Howard Wong et Schotz 2002). La catalyse se fait donc en milieu hétérogène (Zallot 2011), c'est à-dire un mélange de solutions aqueuses et organiques. Pour être actives, les lipases doivent donc avoir la capacité de s'adsorber à l'interface huile-eau. La première lipase entièrement séquencée fut la Lipase Pancréatique en 1981.

Pour entrer en détail dans l'activité proprement parlé des lipases, les chercheurs ont dû prendre en considération deux types de paramètres. Le premier, dépendant du milieu dans lequel la lipase évolue : l'interface huile/eau. Il est essentiel que le substrat de la lipase soit au-dessus de la concentration micellaire critique, c'est-à-dire que les molécules de substrat en grande quantité vont former des micelles dans le milieu

aqueux, faisant apparaître cet interface huile-eau essentiel à l'adsorption de la protéine et donc à son activité.

La deuxième condition est inhérente à la structure de la protéine, qui ne peut être active que si elle possède le **pentapeptide actif G-X-S-X-G**. On peut noter que ce site spécifique est aussi présent dans la famille des sérines protéases. C'est ce site particulier que nous recherchons quand nous faisons des analyses *in silico* de gènes à activité lipase supposée.

Au milieu de toutes les conditions nécessaires pour l'activité, les chercheurs ont voulu discriminer les différents sites selon leur action, afin de découper les lipases en fractions, ayant leur rôle propre. Pour le motif consensus G-X-S-X-G, certaines anciennes études expliquaient que la sérine serait un résidu impliqué dans la liaison interfaciale, mais ne serait pas impliquée dans l'activité enzymatique. Une analyse approfondie sur la séquence de la lipase pancréatique porcine dont le pentapeptide catalytique est : G-H-S-L-G montrait, grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la sérine, que cette dernière est impliquée dans l'adsorption de l'enzyme à l'interface des triglycérides insolubles (Guidoni et al. 1981). En inhibant ce résidu, l'enzyme perd sa capacité à reconnaître les interfaces hydrophobes. Ceci a été contredit plus tard quand la sérine a été décrite pour être le site nucléophile du site catalytique lipase, c'est-à-dire le site responsable de l'hydrolyse des triglycérides, ce qui semble logique, quand on connaît son implication dans l'activité des enzymes de la famille des α/β hydrolases (Emmerich et al. 1992).

Ce site n'est cependant pas le seul nécessaire à l'activité d'hydrolyse, qui est aujourd'hui décrite comme dépendante d'une **triade catalytique**. Cette dernière est composée d'une **sérine** (dans le pentapeptide catalytique), d'un **acide aspartique** et d'une **histidine**. La mutation de ces résidus entraîne l'inactivité enzymatique. L'activité de liaison aux lipides est cependant conservée. On peut donc en conclure que ces résidus, s'ils sont indispensables à l'activité catalytique de l'enzyme, ne sont pas nécessaires pour d'autres fonctions comme la liaison enzyme-substrat (Emmerich et al. 1992). Lors d'une étude de cas sur une patiente atteinte d'une hyperlipidémie de type I, les chercheurs ont montré que l'anomalie était due à un défaut d'interaction entre les lipides et l'enzyme (Lipoprotéine Lipase). Dans ce cas, la triade catalytique n'était pas modifiée et seuls les substrats nécessitant une activation interfaciale n'étaient pas pris en charge. Il apparaît donc grâce à cet article que la triade catalytique n'est pas nécessaire à l'activation

interfaciale de l'enzyme et qu'une autre région remplit cette fonction (Kobayashi et al. 1989). De nombreux sites permettent cette adsorption comme le site FABD par exemple (Sacchetti, Gordon, et Banaszak 1988).

Maintenant que l'on a décrit le pentapeptide catalytique situé dans le coude nucléophile, il est important de comprendre l'interaction entre les différents composants de la triade catalytique. Il est admis aujourd'hui que les 3 acteurs responsables de l'activité des lipases forment ce que l'on appelle « **le trou de l'oxyanion** ». Composé de ces trois acides aminés essentiels, il permet de stabiliser le triglycéride dans la poche catalytique par le passage notamment par un complexe intermédiaire tétrahédrique qui stabilise le complexe pendant l'hydrolyse (Fickers, Destain, et Thonart 2008) (Figure 31). Il n'est donc plus question de détailler l'activité spécifique de chaque acteur mais plutôt de montrer leur interdépendance.

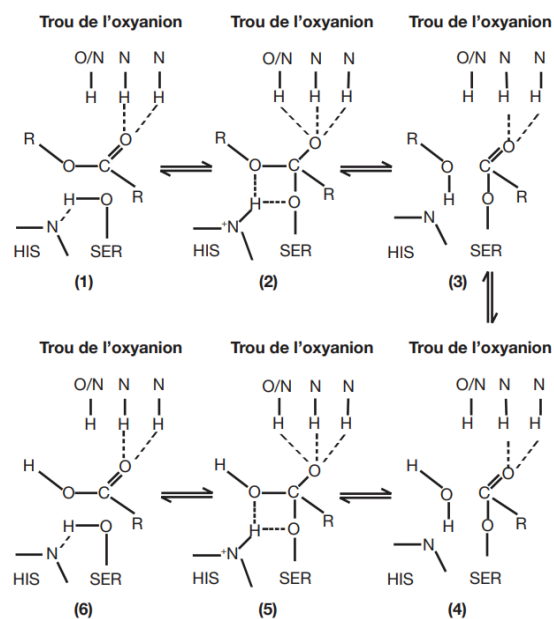


Figure 31 : Représentation schématique de l'hydrolyse d'une liaison ester

Pour résumer l'évolution des hydrolases, les estérases seraient capables d'hydrolyser des triacylglycérols à courte chaîne monodispersés et les lipases seraient des carboxyl-estérases capables d'hydrolyser des TAG émulsifiés à longue chaîne (H Wong et al. 1991a).

3.2.3.2 *Le capot amovible*

Les lipases sont des enzymes aux multiples conditions et réservent une dernière exigence, prenant la forme d'une sorte de dormance. En plus du pentapeptide catalytique, de la triade et de l'activation interfaciale, Elles possèdent un **capot amovible** masquant le site actif et contrôlant son activité.

L'accès à la triade catalytique est bloqué par un capot amovible qui s'ouvre pour laisser rentrer le substrat. L'enzyme est alors exposée à une large surface hydrophile permettant son activation interfaciale (H Wong et al. 1991a). En effet dans un milieu aqueux, la forme prédominante de l'enzyme est la forme dite « fermée », quand le capot amovible empêche l'accès au site actif. Il s'ouvre en présence de matériel hydrophobe (Khan et al. 2017). L'enzyme peut adopter ces deux formes, active et inactive selon l'endroit où elle se trouve et les besoins de la cellule.

Le capot de la lipase est une structure amphiphile qui permet l'accès à la poche catalytique. La face hydrophobe est ainsi exposée et permet la liaison du substrat au site actif (Khan et al. 2017). Le capot peut adopter des structures différentes. Il a été ainsi observé que pour les enzymes dont la température optimale est élevée, le capot est un domaine important comportant au moins deux hélices alors que pour les mono- ou diacylglycérol lipases, le capot est formé d'une simple boucle ou d'une seule hélice. Quand le capot est ouvert, une augmentation du nombre d'hélices α permettrait une thermostabilité accrue de l'enzyme.

Devant la diversité des lipides qui constituent les organismes, on comprend qu'une grande quantité de lipases soit nécessaire. Cette différence de préférence de substrats proviendrait de différences structurales dans les domaines fonctionnels (H Wong et al. 1991a).

3.2.3.3 *Les activités non hydrolitiques : Moonlighting*

Malgré les recherches approfondies dans différentes spécialités, nous ne comprenons que partiellement l'activité des lipases. En effet, il a été démontré par exemple que d'autres activités et d'autres sites actifs peuvent jouer le même rôle que le consensus décrit ci-dessus.

Certaines lipases, comme la lipase hépatique ou la LPL, auraient une activité non enzymatique et serviraient de ligands dans le métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Elles pourraient se lier à des récepteurs de surface cellulaire et des

lipoprotéines pour permettre l'entrée et l'assimilation de lipides indépendamment de la lipolyse (Howard Wong et Schotz 2002).

3.2.3.4 Les modifications de site consensus

L'étude de la lipase LipBL de *Marinobacter lipolyticus* montre la présence pour les enzymes lipolytiques de la famille VIII, de deux sites putatifs catalytiques : S-X-X-K β lactamase et le motif consensus lipase G-X-S-X-G. Les chercheurs ont démontré que seul le site S-X-X-K β lactamase était absolument nécessaire à l'activité lipolytique de l'enzyme, la mutation de la sérine du site consensus entraînant une modification de préférence de substrat, pouvant même se traduire par une augmentation de l'activité de l'enzyme. Ce site serait sur une boucle extérieure et permettrait aussi de lier le substrat (Pérez et al. 2012).

Il semble donc bien compliqué de faire de G-X-S-X-G un pentapeptide consensus lipase si lors de sa mutation, l'activité de l'enzyme n'est pas affectée, voire augmentée.

3.2.4 Les Phospholipases

3.2.4.1 Classement

Les phospholipases sont classées en deux groupes, selon le résidu ester qu'elles hydrolysent dans les glycérophospholipides. On aura ainsi les acyl-hydrolases et les phosphodiesterases.

Les Phospholipases A1, phospholipases A2, phospholipases B, et lyso-phospholipases A1/2 sont les acyl-hydrolases, elles sont décrites comme peu spécifiques de substrat. Les phosphodiesterases sont les phospholipases C et phospholipases D (Smith et Bütikofer 2010).

Il existe quatre liaisons esters dans un phospholipide :

- entre chacun des acides gras et le glycérol
- entre le glycérol et le phosphate
- entre le phosphate et l'alcool (choline, éthanolamine, sérine, glycérol, inositol, ...)

Les phospholipases A1 hydrolysent l'acide gras de la fonction alcool primaire en C1, libérant un acide gras et un lysophospholipide. Les phospholipases A2 hydrolysent l'acide gras de la fonction alcool secondaire en C2, libérant un acide gras et un lysophospholipide ; les phospholipases B hydrolysent les deux acides gras des fonctions alcool en C1 et en C2, libérant deux acides gras et un glycérophosphoryl-alcool. Les

phospholipases C hydrolysent le phosphate et l'alcool de la fonction alcool primaire en C3, libérant un diglycérade et un phospho-alcool. Les phospholipases D hydrolysent l'alcool de la fonction acide du phosphate, libérant un acide phosphatidique et un alcool (Figure 32).

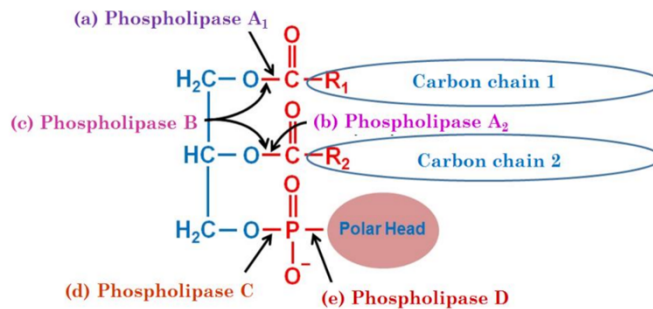


Figure 32 : Action des diverses phospholipases sur les fonctions esters des phospholipides
D'après (Balashev 2014)

3.2.4.2 Rôle des phospholipases

3.2.4.2.1 Les phospholipases A2 (PLA2)

Les phospholipases sont des enzymes omniprésentes qui peuvent intervenir dans différents processus. Les plus connues sont les Phospholipases A2 (PLA2).

La plupart des PLA2 sont désignées comme toxines car elles entrent dans la composition des venins de serpents et d'hyménoptères. Ces enzymes hydrolysent les glycérophospholipides au niveau de la position sn-2 et permettent la libération d'acides gras libres et de lysophospholipides. Les PLA2 peuvent hydrolyser l'acide arachidonique, précurseur des eicosanoïdes et libérer des médiateurs de l'inflammation comme les prostaglandines et les leucotriènes. On peut classer les PLA2 en 15 groupes comprenant 4 types de PLA2 (Burke et Dennis 2009) :

- les PLA2 cytosoliques (cPLA2) : La plus connue de ces PLA2 est la GIVA-PLA2. Elle est présente dans les polynucléaires neutrophiles et les plaquettes humaines et possède une activité lysophospholipase et une activité transacylase. Elle est réputée pour engendrer des processus inflammatoires. Il existe deux inhibiteurs développés par Six et McKew, le 2-Oxoamide et un dérivé indole développé par Wyeth. D'autres équipes tentent de synthétiser des inhibiteurs qui pourraient être utilisés dans les pathologies inflammatoires chroniques comme l'ostéoarthrite ou les dermatites sévères (Kokotou et al. 2017).

- les PLA2 calcium indépendantes (PLA2i) : Le chef de file de ce type de PLA2 est la GVIA-PLA2. Comme leur nom l'indique, ces enzymes n'ont pas besoin de Ca²⁺ pour exercer leur activité catalytique. Une sérine est présente dans le site catalytique de l'enzyme et permet de catalyser la coupure d'une liaison ester sn-2. Elles possèdent également une activité lysophospholipase et transacylase. Ces enzymes auraient une action dans la formation osseuse, l'apoptose, la sécrétion d'insuline et le développement du sperme. Cette enzyme pourrait aussi être impliquée dans la régénération axonale et le recrutement des monocytes (peut-être sous l'action des lysophospholipides qu'elle produit).
- les PLA2 sécrétées (sPLA2) : Elles sont essentiellement retrouvées dans les venins de serpent, d'hyménoptère, les sécrétions pancréatiques et les tissus des mammifères. Elles possèdent une faible masse moléculaire, entre 13 et 15 kD et possèdent une histidine dans leur site actif. Le mécanisme d'action est toujours le même, elles utilisent un proton provenant d'une molécule d'eau et effectuent une attaque nucléophile sur la liaison ester sn-2 d'un phospholipide.
- les platelet activating factor acetyl hydrolase/oxidized lipid lipoprotein associated PLA2 (LpPLA2) : Ces enzymes ont la particularité de pouvoir cliver le groupe acétyle en sn-2 du PAF et peuvent s'associer aux lipoprotéines. Elles peuvent aussi accéder aux substrats présents en phase aqueuse contrairement à toutes les autres PLA. Leur site actif est une triade et comporte une sérine, une histidine et un acide aspartique. La partie C-terminale de ces enzymes, permettrait la liaison aux HDL et LDL. Ces dernières ont un rôle original dans la régulation négative de certaines cascades enzymatiques et un effet anti-inflammatoire. Le niveau d'expression de cette enzyme serait un marqueur d'atteinte coronaire.

Une autre classification, celle de Dennis, permet de classer les PLA2 d'une autre manière mais pour plus de facilité, nous n'utiliserons que la première classification. Ce classement prend en compte la localisation, la sécrétion, la masse moléculaire, les cofacteurs associés etc. Aujourd'hui, au moins 19 PLA2 ont été clonées dans les mammifères (Kudo et Murakami 2002).

Si l'on devait citer un exemple d'activité PLA2, dans le domaine de la parasitologie, il a été décrit que l'inhibition de la PLA2 dans *Toxoplasma gondii* était protectrice de l'invasion des cellules mononuclées par le parasite, de même que pour *Cryptosporidium parvum* (Wilson et Knoll 2018).

3.2.4.2.2 Les enzymes à domaine patatine

Les enzymes à domaine patatine sont une famille d'enzymes aux multiples activités catalytiques dont un domaine formé d'environ 180 AA est conservé (Heitz 2010). Ce domaine est constitué d'un pentapeptide catalytique de motif G-X-S-X-G qui n'entre pas dans la constitution d'une triade comme dans la plupart des autres lipases.

En effet l'activité catalytique de ces enzymes est portée par une dyade constituée de la sérine du pentapeptide catalytique et d'un acide aspartique, sous la forme DXG/A. Ces enzymes peuvent hydrolyser des phospholipides, des lysophospholipides, des triglycérides et seraient exprimées de manière conditionnelle pour certaines, afin de réguler des processus métaboliques comme l'adiponutrine qui aurait un rôle de régulation de la stéatose hépatique (Baulande et Langlois 2010). L'enzyme ExoU du *Pseudomonas aeruginosa*, classée dans la famille des patatines, est une toxine dotée d'activité PLA2 et lysophospholipase, sécrétée par un mécanisme de type III (Sato et Frank 2004). Elle serait directement liée à la pathogénicité pulmonaire de cette bactérie (Pankhaniya et al. 2004). Il semble aujourd'hui que cette famille d'enzymes soit essentielle au métabolisme lipidique, au remodelage membranaire et à la mise à disposition des éléments nécessaires à la structure et l'homéostasie de certains parasites comme les apicomplexes par exemple. Cependant, elles sont bien souvent assimilées à des PLA2 et la littérature n'est pas unanime sur leur classification et sur les points-clés des processus cellulaires dans lesquels elles interviennent (Wilson et Knoll 2018).

3.2.4.2.3 Les phospholipases A1

Historiquement, les PLA1 sont connues pour faire partie du cycle de Lands. Ce cycle permet la déacylation-réacylation des phospholipides dans le but de maintenir l'homéostasie de la structure lipidique qui forme la membrane plasmique des cellules. Cependant, aujourd'hui aucune PLA1 avérée ne fait partie de ce cycle. Par contre, il semblerait qu'elles soient impliquées en tant que facteurs de virulence chez certains microorganismes (Schmiel et al. 1998) et dans la communication cellulaire quand elles génèrent des lysophospholipides bioactifs (Richmond et Smith 2011).

Bien que cela soit plutôt rare, les PLA1 peuvent avoir des substrats préférentiels. C'est le cas de la phosphatidylsérine phospholipase A1 de rat, produite par les plaquettes, et qui

aurait un rôle dans la stimulation des mastocytes, libérant l’histamine lors de signaux d’apoptose cellulaire et entraînant le processus d’inflammation (Aoki 2002).

Chez les mammifères, il existe 9 PLA1 connues, 6 sont extracellulaires et 3 intracellulaires. Elles ont des structures très différentes, ce qui laisse supposer des fonctions bien distinctes (María Laura Belaunzarán, Lammel, et de Isola 2011).

La spécificité de substrat n’est pas absolue et certaines PLA peuvent avoir une activité triacylglycérol lipase par exemple. Peu de choses sont connues aujourd’hui sur ces PLA1, ce qui en fait un sujet de recherche intéressant d’autant plus si on imagine le très grand nombre de rôles qu’elles peuvent exercer dans une cellule.

3.3 Les produits de dégradation des phospholipides

Un glycérophospholipide est un lipide complexe amphiphile, composé d’une molécule de glycérol estérifiée à deux acides gras et d’un phosphate (Figure 33). Cet acide phosphatidique est lié à l’alcool d’une molécule polaire, qui constitue la tête polaire. Les phospholipases vont hydrolyser divers glycérophospholipides. Les têtes polaires peuvent être différentes, comme par exemple constitué d’une molécule de choline, d’éthanolamine ou de sérine. Pour clarifier la situation dans la littérature, une nouvelle classification a vu le jour en 2009 (Fahy et al. 2009).

TABLE 3. Changes in abbreviations for Glycerophospholipids in the comprehensive classification system

Class	Synonym	Old	New
Glycerophosphocholines	Phosphatidylcholines	GPCho	PC ^a
Glycerophosphoethanolamines	Phosphatidylethanolamines	GPEtn	PE
Glycerophosphoserines	Phosphatidylserines	GPSer	PS
Glycerophosphoglycerols	Phosphatidylglycerols	GPCro	PG
Glycerophosphoglycerophosphates	Phosphatidylglycerol phosphates	GPCroP	PGP
Glycerophosphoinositols	Phosphatidylinositols	GPIIns	PI
Glycerophosphoinositol monophosphates	Phosphatidylinositol phosphates	GPInsP	PIP
Glycerophosphoinositol bis-phosphates	Phosphatidylinositol bis-phosphates	GPInsP2	PIP2
Glycerophosphoinositol tris-phosphates	Phosphatidylinositol tris-phosphates	GPInsP3	PIP3
Glycerophosphates	Phosphatidic acids	GPA	PA
Glyceropyrophosphates		GPP	PPA
Glycerophosphoglycerophosphoglycerols	Cardiolipins	CL	CL
CDP-glycerols		GCDP	CDP-DG
Glycosylglycerophospholipids		[glycan]GP	[glycan]GP
Glycerophosphoinositolglycans		[glycan]GPIIns	[glycan]PI
Glycerophosphonocholines		GPnCho	PnC
Glycerophosphonoethanolamines		GPnEtn	PnE

^a For abbreviations of monoradylglycerophospholipids (lysophospholipids), LPX may be used, for example, LPC, LPE, LPA, etc.

Figure 33 : Ancienne et nouvelle annotation concernant les Glycérophospholipides les plus répandus

D’après (Fahy et al. 2009)

Afin de mieux comprendre les différentes têtes polaires des glycérophospholipides, la Figure 34 est associée au tableau des annotations.

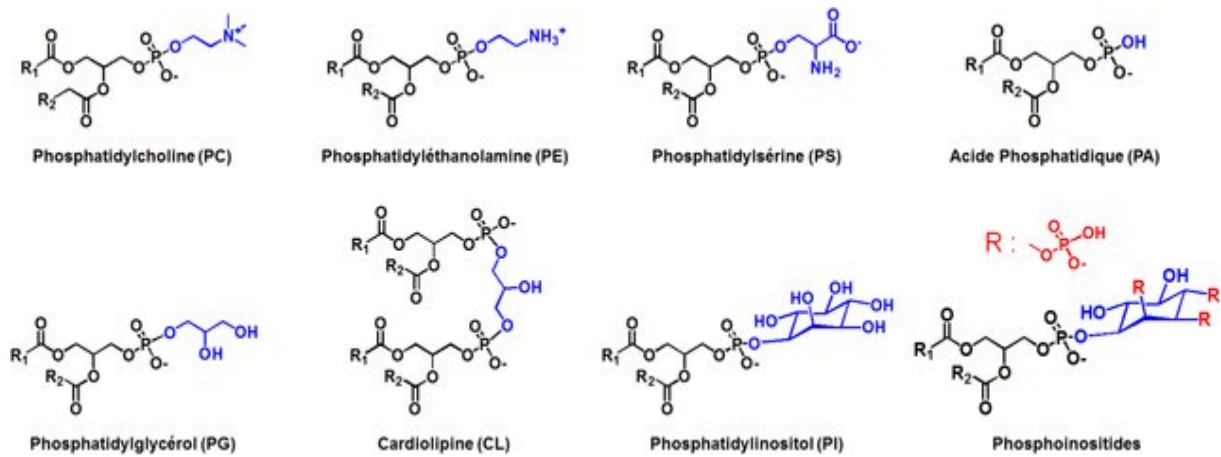


Figure 34: Formule semi-développée des différents glycérophospholipides pouvant être les substrats des phospholipases

D'après la thèse du Dr. Renaud Rahier

3.3.1 Les lysophospholipides

3.3.1.1 Composition

Un lysophospholipide est un composé résultant de l'hydrolyse d'un phospholipide, lipide vrai complexe, par une phospholipase (PL) au niveau d'un acide gras déterminé. Si le phospholipide est hydrolysé au niveau de la région sn-1 nous aurons affaire à une PLA1 entrainant la formation d'un 1-lysophospholipide et si nous avons affaire à une PLA2, l'hydrolyse s'effectuera au niveau du sn-2 et donnera un 2-lysophospholipide.

3.3.1.2 Rôle

Les lysophospholipides sont habituellement décrits comme des composants membranaires qui permettent la synthèse de phospholipides. Ils sont maintenant aussi considérés comme des molécules bioactives qui agiraient selon une activité « hormone-like ». Ils sont nécessaires à l'homéostasie de nombreux processus physiologiques comme la reproduction, le développement vasculaire et le fonctionnement du système nerveux central. La lysophosphatidylcholine exogène par exemple, augmenterait l'activité de phagocytose des macrophages (Liu et al. 2020).

Certains lysophospholipides, comme un analogue du 2-LPC, l'edelfosine, sont utilisés en cancérologie (Mollinedo et al. 2004). D'autres molécules comme la miltéfosine sont

utilisées dans le traitement des leishmanioses viscérales. La miltéfosine appartient à la classe des alkyl-phosphatidylcholine, structurellement proche des alkyl-lysophospholipides qui sont des analogues de la lysophosphatidylcholine (qui aurait perdu un glycérol) et agirait comme un inhibiteur d'Akt (Dorlo et al. 2012).

Les lysophospholipides entrent dans la famille des médiateurs de l'inflammation. C'est à ce titre qu'ils peuvent par exemple entraîner une vasodilatation endothéliale. Certains médiateurs lipidiques ont été bien étudiés comme par exemple le Sphingosine-1-P. La signalisation du Sphingosine-1-P (S1P1), médiée par une Protéine G rentre dans les processus inflammatoires mais aussi dans la régulation de la migration, de la prolifération et de l'adhésion des cellules du système immunitaire et leur sortie des organes lymphoïdes secondaires (Sevastou et al. 2013). En effet, S1P1 serait requis d'abord pour la maturation des thymocytes et leur migration depuis le thymus puis pour la migration des lymphocytes B depuis la rate et les tissus lymphoïdes. Ce médiateur lipidique est donc un acteur essentiel dans l'inflammation et la réponse immune. On peut donc comprendre pourquoi le Dr Matloubian et ses collègues pensent qu'un inhibiteur sélectif de S1P1 pourrait être un immunosuppresseur efficace (Matloubian et al. 2004). Aussi, un analogue du S1P1, le fingolimod, a pour propriété d'exercer une action immunomodulatrice sur les lymphocytes responsables de la destruction des gaines de myélines dans la sclérose en plaque. Son action étant ubiquitaire, ce traitement possède en outre de nombreux effets indésirables comme par exemple l'hypertension, la bradycardie ou l'œdème maculaire (Mandal et al. 2017).

3.3.2 Les acides gras libres

3.3.2.1 Composition

Les acides gras sont des acides carboxyliques R-COOH dont le radical R est une chaîne aliphatique de type hydrocarbure de longueur variable (C4 à C36) qui donne à la molécule son caractère hydrophobe. Les acides gras peuvent être saturés, c'est-à-dire qu'ils ne possèdent pas de double liaison carbone dans leur chaîne aliphatique, ou insaturés, ils possèdent une ou plusieurs doubles liaisons. Il existe bon nombre d'acides gras naturels saturés et insaturés.

3.3.2.2 Rôles

Les acides gras sont stockés dans l'organisme sous forme de triglycérides (Figure 35) c'est à dire une association de trois acides gras et d'une molécule de glycérol qui sont

reliés par une liaison ester. Ils sont une source d'énergie plus importante que les glucides et sont essentiels pour les périodes de jeûne. Les acides gras peuvent aussi être synthétisés par la cellule par l'intermédiaire de processus métaboliques entrant dans la lipogénèse ou récupérés par la cellule par un phénomène d'endocytose de lipides, hydrolysés ensuite en acides gras.

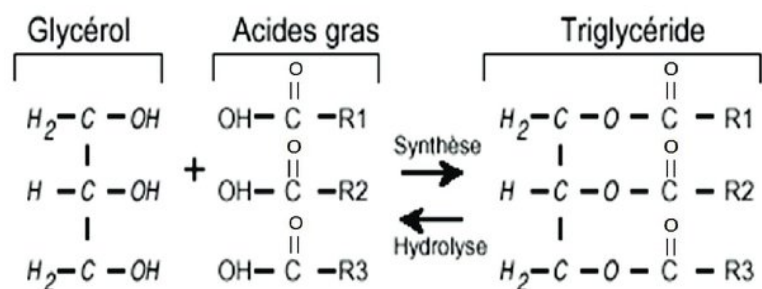


Figure 35 : Réaction de synthèse des triglycérides par la triglycéride synthase ou de lyse par une lipase
D'après Marine Dancer

Maintenant que nous connaissons mieux les lipides et leurs produits de dégradation grâce aux lipases et notamment aux phospholipases, nous pouvons nous intéresser plus particulièrement à leur importance dans l'organisme qui nous intéresse, le trypanosome africain.

3.4 Les Lipides dans le trypanosome africain

Les lipides sont une part importante de la constitution des cellules et plus particulièrement de la membrane plasmique qui se doit d'être hydrophobe dans sa globalité, permettant de protéger la cellule de l'environnement extérieur. Les lipides constituent 11 à 18 % du poids sec du trypanosome africain (Smith et Bütikofer 2010). Les lipides les plus présents dans les trypanosomes sont la phosphatidylcholine (PC) représentant 45 à 60% des phospholipides totaux du parasite et la phosphatidylethanolamine (PE) représentant 10 à 20%. Le phosphatidylinositol (PI), la phosphatidylsérine (PS) et la cardiolipine (CL) sont des glycérophospholipides mineurs. Le trypanosome contient aussi des sphingophospholipides, comme la sphingomyéline (SM), l'inositol phosphorylcéramide (IPC) et l'éthanolamine phosphorylcéramide (EPC) (Figure 36). Les trypanosomatides sont les seuls organismes connus capables de synthétiser des sphingolipides avec de la choline, de l'éthanolamine et de l'inositol au niveau du groupement de tête du lipide (Dickie, Young, et Smith 2019).

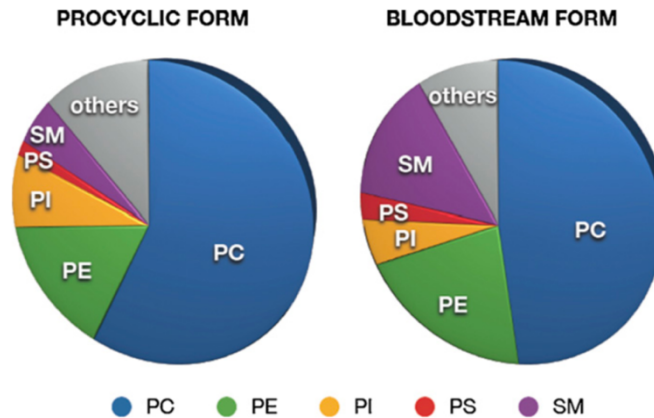


Figure 36: Répartition des différents types de lipides du trypanosome africain pour les formes procycliques à gauche et sanguines à droite.
D'après (Smith et Bütikofer 2010)

Chez les trypanosomes africains, cellules hétérotrophes, l'acquisition de lipides survient de deux manières :

- Synthèse *de novo* de lipides à partir de précurseurs
- Acquisition de lipides à partir du milieu extérieur, par endocytose

L'essentiel de mon travail porte sur l'acquisition de lipides à partir du milieu extérieur, leur catabolisme et leur rôle dans le métabolisme et la survie du trypanosome.

Le trypanosome africain a besoin de récupérer des phospholipides exogènes pour satisfaire ses besoins nutritionnels et de survie. Pour cela, une première méthode d'acquisition a été décrite par le Dr Bowes et ses collègues. Il existe une triade de trois enzymes qui permet de récupérer les lysophospholipides (LPL) du milieu extérieur afin qu'ils soient utilisés par le parasite. Cette triade est composée d'une phospholipase A1 qui permet de générer des acides gras, utilisés ensuite par la deuxième enzyme, la ligase, qui permet de former de l'acylCoA. L'acyltransférase permet ensuite d'acyler grâce à l'acylCoA formé, une nouvelle molécule de LPL (Bowes et al. 1993). L'acquisition d'acyl gras est essentielle pour le remodelage et la biosynthèse du VSG et donc la survie du parasite. Le Dr. Bowes pensait que cette PLA1, à laquelle nous nous intéressons tout particulièrement était membranaire. Il se peut avec le recul que nous avons aujourd'hui que cette dernière soit sécrétée afin de produire dans le milieu extérieur les lysophospholipides nécessaires.

Les trypanosomes produisent diverses sortes de lipides, les inositol phosphocéramides (IPC), et les fungal-like phosphosphingolipides par exemple qui sont absents dans l'hôte mammifère. Les formes sanguines du *Trypanosoma brucei* synthétisent aussi les

phosphoéthanolamine céramides (EPC) qui sont très peu retrouvées chez l'hôte mammifère. On comprend bien ici pourquoi ces différents lipides ont été sélectionnés comme des cibles potentielles pour le développement de médicaments (Guan et Mäser 2017) et que le métabolisme des lipides soit aujourd'hui une clef, qui jusque-là fut très peu exploitée dans la compréhension globale du parasite et dans la recherche de nouveaux traitements.

On peut imaginer que nous pourrions définir l'activité des lipases que j'ai commencé à étudier par la recherche des différents acides gras et lysophospholipides créés par leur action catalytique. Ces études sont menées aujourd'hui par un laboratoire partenaire à St Andrews, en Ecosse, où j'ai eu la chance de faire un stage de 3 mois (chapitre 3 partie 1.3.9 de cette thèse)

3.5 Les phospholipases dans les trypanosomatides

Depuis de nombreuses années, l'activité phospholipase intrinsèque au trypanosome est avérée. On ne sait hélas toujours pas faire la part de ces différentes activités. Il est cependant aujourd'hui acquis que le trypanosome possède trois activités différentes : une PLA1, une PLA2, et une PLC. Seulement trois PL ont été étudiées à ce jour dans le *Trypanosoma brucei* : PLA1, PLC-GPI (PLC-Glycerophosphatidylinositol) et PLC-Pi (PLC-Phosphatidylinositol).

La littérature concernant les phospholipases du parasite étant ancienne et la proximité des parasites génétiquement proche, justifie mon intérêt pour la description de phospholipases appartenant à d'autres trypanosomatides.

3.5.1 L'activité phospholipase majoritaire

Lors d'anciennes études sur *Trypanosoma cruzi*, il a été suggéré que les acides gras libres et les lysophospholipides sont les principaux acteurs de la déstabilisation des membranes cellulaires de l'hôte et notamment des érythrocytes en contact direct avec le parasite (Luján et Bronia 1994). Deux processus entreraient en jeu, l'un, calcium dépendant, induisant la fusion du parasite avec le globule rouge de l'hôte et l'autre calcium indépendant, induisant la lyse du globule rouge. Le contenu cytoplasmique du parasite n'est pas en mesure d'induire une lyse cellulaire contrairement aux membranes et organites spécifiques qui, mis en contact avec le globule rouge, induisent sa lyse ou sa

fusion en fonction de la présence de calcium. L'enzyme la plus probablement à l'origine de ce phénomène serait une PLA2. Ceci a été confirmé par les auteurs qui, à la suite d'ajout d'inhibiteurs de PLA2, n'observent plus ni fusion, ni lyse des érythrocytes. La déstabilisation des membranes par échange de lipides permet une augmentation de calcium dans les cellules hôtes et l'activation de cascades enzymatiques calcium dépendantes (Luján et Bronia 1994). Ceci est applicable à *Trypanosoma cruzi* pour lequel un cycle intracellulaire est décrit et donc une pénétration des cellules de l'hôte par le parasite est nécessaire.

Cependant, selon d'autres études, menées sur *Trypanosoma brucei* cette activité PLA2 n'est pas l'activité phospholipase majoritairement présente chez le parasite. En effet, l'activité la plus abondante proviendrait des PLA1 et coïnciderait avec la pathogénicité des différentes espèces africaines, c'est-à-dire que plus une espèce est pathogène pour son hôte plus importante est l'activité PLA1 (Hambrey, Mellors, et Tizard 1981).

Il est intéressant de noter que déjà les auteurs faisaient le lien entre la localisation du parasite dans l'organisme et l'abondance de phospholipases. Ils émettent en effet l'hypothèse que si *Trypanosoma brucei* possède une plus grande activité PLA1 c'est parce que ce parasite se distribue dans les tissus et pas seulement dans le compartiment sanguin, contrairement à *Trypanosoma congolense* par exemple. De plus, les dommages majeurs causés aux endothéliums des vaisseaux des hôtes porteurs de trypanosomes sont plus importants lors de la lyse de parasites contenant une plus grande quantité de phospholipases. D'après les connaissances actuelles, aucune activité PLD n'a été détectée dans le trypanosome africain (Plonski et al. 2018).

3.5.2 Les fonctions supposées

Aujourd'hui plusieurs pistes d'étude, ouvertes il y a un peu plus de quarante ans sont la base de notre projet sur les phospholipases du trypanosome africain. Nous allons donc énumérer des conclusions d'articles qui seront un support à l'ensemble de cette thèse. Tout l'enjeu des phospholipases repose sur l'intrication entre leur localisation et leur fonction. Plus généralement leur capacité à hydrolyser les lipides qui rendent le VSG soluble, qui permettent le remodelage membranaire et du manteau parasitaire, l'action métabolique et leur lien avec la physiopathologie, et plus particulièrement comme nous l'avons vu plus haut, avec l'anémie.

3.5.2.1 *L'activité au niveau du manteau VSG*

Il existerait une PLA-GPI spécifique, probablement une PLA2 qui permettrait la formation d'un lysophospholipide qui serait ensuite myristoylé par une myristoyl transférase pour permettre le remodelage du VSG. Cette PLA n'a pas encore été décrite (Masterson et al. 1990).

Une étude antérieure précise qu'une autre phospholipase serait transmembranaire et permettrait d'hydrolyser un acide myristique, lipide pourtant peu présent dans le trypanosome et conférerait à cette lipase une activité très spécifique (Ferguson et Cross 1984) afin de décrocher le VSG de la membrane plasmique et le rendre soit soluble, soit permettre son remodelage.

3.5.2.2 *L'acquisition de lipides exogènes*

Les trypanosomes africains n'ont pas une grande capacité à synthétiser les lipides *de novo*. L'essentiel de l'apport lipidique nécessaire à leur survie se fait par l'acquisition d'acides gras, comme par exemple l'acide palmitique et linoléique. Certains parasites comme *Trypanosoma lewisi*, ont une mitochondrie fonctionnelle qui permet d'oxyder le pyruvate en acetylCoA, ce qui n'est pas le cas de *Trypanosoma brucei*.

Les phospholipides constituent 80% de la totalité des lipides du trypanosome africain (Mellors et Samad 1989). Afin d'acquérir les lipides le constituant, le trypanosome africain utilise une PLA1 membranaire capable de lyser la PC (et d'autres glycérophospholipides) et de créer un lysophospholipide. Ce 1-lysophospholipide (2-acyl-3-*sn*-glycérophosphocholine) est réarrangé en 2-lysophospholipide, ce qui permet à la même PLA1 qui aurait aussi une activité lysophospholipase, d'acquérir des acides gras et du phosphoglycérol. Une acyltransférase, permettrait d'acyler le lysoPC produit afin de créer de nouveau de la PC, incorporable dans les membranes parasitaires (Mellors et Samad 1989).

3.5.2.3 *L'activité hémolytique*

L'activité hémolytique présente lors de la trypanosomiase africaine est un sujet encore aujourd'hui méconnu et les mécanismes mis en jeu dans ce processus sont encore à l'étude. Nous vous ferons part ici des divergences d'opinion sur le sujet et quelle place cette thèse peut prendre dans la recherche de ces mécanismes.

- La phospholipase A1 retrouvée majoritairement dans les espèces pathogènes de trypanosome, serait à l'origine du relargage d'acides gras tels que le stéarate, le palmitate, l'oléate ou le linoléate capables d'induire une hémolyse. En effet, lors d'une lyse parasitaire, la PLA1 continue d'être active et constitue un pool d'acides gras en hydrolysant les lipides membranaires des parasites mourants. Les acides gras relargués en conséquence et diffusés dans le compartiment sanguin, seraient à l'origine de la lyse des globules rouges. En d'autres termes, la PLA1, probablement membranaire, ne suffirait pas à elle seule à lyser directement les globules rouges, mais le relargage d'acides gras libres pourraient entrer en jeu dans le processus d'hémolyse (Mellors et Samad 1989).
- La PLA1 présente dans les capillaires lors de l'agrégation des parasites peut mener à un endommagement des vaisseaux sanguins mais il n'a pas été prouvé que l'hémolyse due à la pathologie était intravasculaire c'est-à-dire à l'intérieur du vaisseau, au contact direct du parasite. Ce qu'il est intéressant de noter c'est que le parasite mort ou mourant va déverser dans le sang, au contact des cellules et tissus de l'hôte, un contenu intracellulaire très toxique et très riche en PLA1. La quantité de PLA1 présente dans le parasite à la forme procyclique n'est que de 15% de celle contenue dans le parasite sanguin, appuyant l'hypothèse que cette PLA1 pourrait avoir un rôle essentiel dans la relation hôte mammifère et pathogène ou qu'elle aurait un lien avec la profonde restructuration lipidique et métabolique du parasite entre les différents stades. L'étude de cette PLA1 montre qu'elle est associée à la membrane du parasite, a une masse moléculaire d'environ 28kD et permet l'hydrolyse de longues chaînes de phosphatidylcholine et de lysophosphatidylcholine (Mellors et Samad 1989).
- Il a été décrit que la quantité de lysophosphatidylcholine dans le plasma des ruminants était diminuée quand il est contaminé par des trypanosomes. En effet, la libération de PLA1 et de LysoPL (Tizard et al. 1977) dans le sang interférerait avec le métabolisme endogène de l'hôte entraînant une diminution des phospholipides sanguins, de la formation des HDL, de l'activité de certaines enzymes, une accélération de l'agrégation plaquettaire et de la formation de mini thrombus, participant à la symptomatologie (C. J. Roberts et al. 1977).
- Cependant, dans les années 1980, de nombreuses expériences ont été réalisées afin de déterminer la cause principale de l'anémie (Amole, Clarkson, et Shear

1982a). Les chercheurs ont mis en évidence que l'essentiel du mécanisme de l'anémie était l'œuvre d'un système immunitaire sur-stimulé. En effet, lors des vagues successives de parasitémie, l'organisme produit une multitude d'anticorps IgM non spécifiques contre le pathogène. Les IgM s'adsorbent sur les globules rouges sur lesquels les antigènes parasitaires se sont déposés, les fragilisant et les rendant reconnaissable pour le système du complément qui met en place une machinerie de destruction massive, conduisant à une diminution du nombre effectif de globules rouges (Kobayashi, Tizard, et Woo 1976). Cet événement n'est que le premier d'une cascade entraînant une splénomégalie et la surproduction de globules rouges pour essayer sans succès de compenser la perte initiale, qui peu à peu épuise les différents acteurs de l'organisme (Biryomumaisho et Katunguka-Rwakishaya 2007).

- Une expérience très intéressante de lyse parasitaire intravasculaire ne montre pas qu'il y ait dans le contenu parasitaire de facteurs d'hémolyse important entraînant une anémie d'origine hémolytique (Amole, Clarkson, et Shear 1982b). Cela contredit l'étude précédente qui expliquait que le contenu toxique des parasites pouvait être l'origine de l'anémie.
- D'autres pistes, comme la présence d'acides gras spécifiques après la lyse parasitaire intravasculaire ont été étudiées dans la fragilisation des globules rouges de l'hôte. Cependant, il ne semble pas que ces acides gras aient un effet sur l'homéostasie des globules rouges *in vivo*, ce mécanisme de l'anémie n'a donc pas été retenu comme mécanisme principal au fil du temps (Tizard, Holmes, et Nielsen 1978).

Nous observons donc ici que les auteurs qui pensaient les phospholipases responsables de l'anémie se sont rangés à l'hypothèse immunologique de destruction des globules rouges.

Pourtant, le postulat que la réaction immunitaire serait responsable presque exclusivement de l'anémie pose problème pour les animaux trypanotolérants. En effet, ces animaux subissent des vagues successives de parasite en intravasculaire. Leur système immunitaire est sur-stimulé par la quantité de parasites présents. La seule différence connue aujourd'hui provient de la structure de leurs globules rouges. Or, il est peu probable que les anticorps ne s'adsorbent pas sur les globules rouges des animaux trypanotolérants après lyse parasitaire. Donc, malgré l'hypothèse d'une anémie causée

par l'action du système immunitaire, une autre option doit être exploitée. Nous ne pouvons aujourd'hui pas faire un raccourci entre l'activité des phospholipases et l'anémie mais il nous appartient de continuer à étayer cette hypothèse pour toujours mieux comprendre le rôle de ces lipases particulières.

Il apparaît nécessaire donc, en regard de toutes les fonctions que peuvent avoir les phospholipides et les phospholipases de les étudier plus en détail.

3.5.3 Les phospholipases A1

Des études de localisation ont permis de montrer que l'activité PLA1 dans le trypanosome africain était d'une part due à une PLA1 soluble, et d'autre part à une PLA1 contenue dans les lysosomes. Cette enzyme aurait une activité 10 fois moindre que la PLA1 soluble mais elle aurait l'avantage d'être constante dans la forme procyclique et dans la forme sanguine, ce qui n'est pas le cas pour la PLA1 soluble qui voit son activité diminuée jusqu'à obtenir une activité PLA1 totale de 15% lors de son évolution dans l'insecte. On suppose donc que l'action de la forme lysosomale serait plutôt liée au métabolisme cellulaire, permettant la fusion des membranes et de dégrader les composants phagocytés dans les phagolysosomes ou les vacuoles autophagiques (Opperdoes et van Roy 1982).

Chez *Trypanosoma congolense*, il a été montré que l'activité PLA1 permet la formation d'acides gras libres entraînant une activité hémolytique qui n'est pas présente dans des espèces non virulentes comme *Trypanosoma lewisi* par exemple (Tizard et al. 1978), (María Laura Belaunzarán, Lammel, et de Isola 2011).

La première PLA1 étudiée en détail chez *Trypanosoma brucei brucei*, serait responsable de 80 % de la formation des lysophosphatidylcholines, ce qui suggère la présence d'une autre enzyme à activité PLA1 dans le parasite qui comblerait les 20% restant. Le site actif de cette enzyme se trouve sur la Ser131, elle est soluble, cytoplasmique et a une masse moléculaire de 35kD (Richmond et Smith 2007b). Cette phospholipase n'agirait que sur les phospholipides exogènes. Son existence dans le parasite est très originale puisqu'elle proviendrait d'une transmission horizontale d'un endosymbionte bactérien de la mouche tsétsé, le *Sodalis glossinidius*, vers le trypanosome. Cette découverte est appuyée par une analogie génique entre cette PLA1 et celle retrouvée dans *Yersinia enterocolitica* ou dans *Serratia liquefaciens*. Cependant la PLA1 du trypanosome aurait perdu au cours de l'évolution, le peptide signal permettant sa sécrétion, toujours présent dans les deux PLA1 orthologues de bactéries (Richmond et Smith 2007b).

Chez *Trypanosoma cruzi* la seule PLA1 étudiée est liée à la membrane et peut hydrolyser des phospholipides zwitterioniques en l'absence de cations bivalents et plus particulièrement la phosphatidylcholine et la phosphatidylethanolamine. Elle possède une activité Protéine Kinase C (PKC) activatrice par l'intermédiaire de la formation de seconds messagers tels que les FFA, DG et LPC. Cette activité est uniquement retrouvée dans les stades infectants du cycle du parasite et permet d'augmenter le processus d'invasion (M. L. Belaunzarán et al. 2007). Cette enzyme peut se retrouver sous forme de dimère ou de tétramère. Cette PLA1 présente chez *Trypanosoma cruzi* possède 11,4 % d'identité avec celle présente chez *Trypanosoma brucei brucei* (María Laura Belaunzarán et al. 2013). Les auteurs suggèrent que la présence d'anticorps contre ces protéines pourrait neutraliser l'effet toxique de ces enzymes.

3.5.4 Les phospholipases A2

L'activité PLA2 présente dans les trypanosomatides aurait une action hémolytique et anticoagulante. Cette activité a notamment été retrouvée chez *Trypanosoma congolense* et ne semble pas affecter les cellules humaines (Nok et al. 1993). Le Dr. Nok explique que la raison pour laquelle elle n'est pas pathogène serait parce que *Trypanosoma congolense* est inoffensif pour l'Homme. Cette PLA2 serait composée de deux sous-unités de 16,5 kD et de 18 kD.

Cette même étude a montré que les globules rouges de bovins trypanotolérants sont moins sensibles à la lyse par la PLA2 de cobra que ceux de bovins trypanosensibles. Chez *Trypanosoma brucei*, l'activité PLA2 serait stimulée par l'apport de Ca^{2+} et permettrait le relargage d'acide arachidonique ((Eintracht et al. 1998)). L'acide arachidonique produit de manière endogène permet de moduler les flux de Ca^{2+} suggérant la participation de l'activité PLA2 dans la signalisation cellulaire (Sevastou et al. 2013).

3.5.5 Les phospholipases C

Il existe chez le trypanosome africain, deux phospholipases C identifiées et décrites. La phosphatidylinositol 4,5-bis-phosphate est hydrolysée par une phospholipase Pi-PLC (Tb927.11.5970) et génère des seconds messagers comme le DAG et IP3. L'IP3 se fixe à son récepteur au niveau du RE et permet le relargage de calcium dans le cytosol.

Les 20 premiers acides aminés de cette protéine sont très intéressants car ils permettent la localisation membranaire de la protéine. Cette phospholipase est calcium

dépendante, localisée au niveau des membranes des vésicules intracellulaires (King-Keller et al. 2015).

La deuxième PLC est impliquée dans le remodelage du VSG. C'est plus précisément une GPI-PLC qui permet d'hydrolyser l'ancre GPI maintenant le VSG accroché à la membrane du parasite. Cette PLC n'est active que dans les formes pourvues d'un VSG c'est-à-dire les formes métacycliques et sanguines du parasite. Cette protéine semble essentielle au cycle parasitaire au moment de l'apparition des formes procycliques dépourvues de VSG. Cette protéine est localisée au niveau de la surface extérieure de la membrane plasmique, au contact du VSG, le long du flagelle (Hanrahan et al. 2009).

Malgré un vaste sujet ouvert depuis de nombreuses années sur le rôle des phospholipases dans les kinétoplastidés, force est de constater que peu d'entre elles ont été décrites aujourd'hui. On ne connaît qu'une partie des phospholipases mises en jeu et leur rôle dans l'homéostasie du parasite.

On peut donc se demander : « Au sein du parasite, quelle va être l'importance des lipides et de quelle manière vont-ils agir et être utilisés afin de permettre la survie et la croissance du trypanosome ? Comment s'articulent les différentes lipases pour permettre le fonctionnement du parasite ? »

3.6 Projet de thèse

Mon projet de thèse porte sur l'étude de plusieurs candidats identifiés *in silico*, porteurs du pentapeptide catalytique et pouvant coder pour des protéines à activité phospholipase. Nous avons essentiellement travaillé sur 4 candidats dont nous proposons les noms génériques suivants : TbPLA1b, TbPLA1c, TbPLA1d et TbbLa. Le gène codant pour la TbPLA1 déjà étudiée par T. Smith a été renommé dans mon travail « TbPLA1a » afin de différencier les autres éventuelles PLA1 du trypanosome africain. Nous avons ainsi adapté notre nomenclature à cette première PLA1 décrite.

Nous nous sommes intéressés à la localisation particulière de chaque candidat et sa fonction au sein du parasite.

Durant cette étude (Figure 45), nous avons localisé une partie des protéines sur lesquelles nous avons travaillé grâce à des techniques de surexpression ou

d'endotagging dans le parasite. Afin de déterminer l'activité des protéines cibles, nous avons tenté de les exprimer de manière hétérologue. Certaines approches nous ont permis d'appréhender la fonction de certains candidats et leur coordination fonctionnelle. Par cela nous entendons une collaboration d'activité entre différentes lipases, appelée redondance. Cette observation a été faite dans bien d'autres organismes vivants. En effet, nous supposons que l'absence d'une lipase, entraîne l'expression plus grande de certaines autres, qui pourraient avoir une fonction similaire pour maintenir l'homéostasie du parasite.

Nous présenterons pour commencer les résultats concernant TbPLA1b qui ont donné lieu à un article scientifique en cours de révision. Les travaux sur cette protéine ne se sont pas arrêtés à l'article et quelques données supplémentaires notamment des données de lipidomique, seront présentées.

Ensuite nous présenterons en parallèle les résultats que nous avons obtenus concernant le questionnement sur les activités et la redondance de fonction des différents candidats à activité phospholipase putative.

Chapitre 2 : Matériel et Méthode

1 Culture cellulaire des parasites

1.1 Lignées cellulaires utilisées

1.1.1 427

Les lignées de *Trypanosoma brucei brucei* 427 (formes sanguines) utilisées possèdent dans leur génome deux plasmides le pLEW-13 et pLEW-90. Le pLEW-13 code pour l'ARN polymérase T7 et le pLEW-90 code pour le répresseur à la tétracycline dont l'expression est sous la dépendance du promoteur de l'ARN polymérase T7. Ces vecteurs confèrent également la résistance à la néomycine (pLEW-13) et à l'hygromycine (pLEW-90). Les lignées ayant intégré ces plasmides permettent ainsi la transcription de fragments d'ADN de manière conditionnelle. En effet, en l'absence de tétracycline, un fragment d'ADN placé en aval de l'opérateur tétracycline ne sera pas transcrit car le répresseur de la tétracycline se fixe sur la séquence de l'opérateur et constitue un obstacle à l'élongation de l'ARN polymérase.

En présence de tétracycline, l'antibiotique se lie au répresseur de la tétracycline qui ne peut plus se fixer sur l'opérateur, conduisant à une transcription du fragment d'ADN situé en aval.

1.1.2 Antat

Les lignées de *Trypanosoma brucei brucei* Antat1.1 sont des cellules sauvages induisant une infection chronique chez la souris. Elles sont moins virulentes que les cellules 427 et induisent une mort de l'hôte moins rapide. Elles ne possèdent pas de plasmides particuliers.

Durant ma thèse nous avons réalisé une variante de cette souche permettant l'expression conditionnelle de deux gènes sans réintroduire d'antibiotique de résistance. Pour cela nous avons utilisé un plasmide particulier le pJ1173 (Sunter 2016) (Figure 37) présentant la particularité de permettre l'expression de fragments d'ADN de manière conditionnelle grâce à la tétracycline ou grâce à l'acide vanillique. Cette variante est appelée Antat 1173. La délétion de gènes codant pour les PL par la technique de « Knock-out » a été réalisée dans le contexte de cette souche.

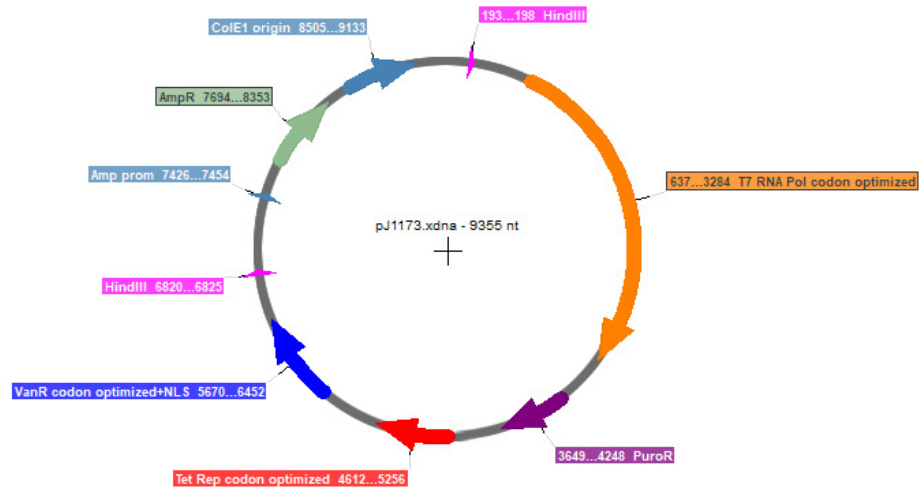


Figure 37 : Représentation schématique du plasmide pJ1173

Le plasmide pJ1173 comporte un gène de résistance à la puromycine qui permet de vérifier son intégration. Il est dérivé du plasmide Smox et permet de mettre en jeu deux mécanismes d'expression conditionnelle.

1.2 Milieux de culture

Les formes sanguines se cultivent en atmosphère humide à 37°C, avec 5% de CO₂ dans un milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 0,25 mM β-mercaptoéthanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0,16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0,05 mM bathocuprone et 2 mM L-cystéine (Hirumi et Hirumi 1989). Lors de mes expériences sur les quantités modifiées de sérum, j'ai adapté le milieu IMDM avec 0,75% à 40 % de sérum. Les milieux de culture sont aussi supplémentés en antibiotiques spécifiques. Ces antibiotiques sont ajoutés au milieu selon la résistance acquise des différents mutants (Figure 38).

Concentration des antibiotiques de résistance pour les formes sanguines :

- Hygromycine = 5µg/mL
- Néomycine = 2,5 µg/mL
- Phléomycine = 2,5 µg/mL
- Blastidicine = 5µg/mL
- Puromycine = 0,1µg/mL

427	néomycine	hygromycine	puromycine	blasticidine	phléomycine
KOTbPLA1b	×	×	×	×	
KoTbPLA1bARNiTbPLA1a	×	×	×	×	×
KoTbPLA1bARNiTbPLA1c	×	×	×	×	×
KoTbPLA1bARNiTbPLA1d	×	×	×	×	×
KoTbPLA1bARNiTbbLa	×	×	×	×	×
KOTbPLA1bTyTbPLA1b-SKS	×	×	×	×	×
KOTbPLA1bTyTbPLA1b	×	×	×	×	×
KOTbPLA1bTyTbPLA1bSKL	×	×	×	×	×
KOTbPLA1bA3TyTbPLA1b-SKS	×	×	×		×
TyTbPLA1b	×	×			×
TyTbPLA1b-SKS	×	×			×
TyTbPLA1bSKL	×	×			×
ARITbbLa	×	×			×
Ty-eYFP-Ty-TbPLA1c	×	×		×	
TbPLA1c10Ty	×	×		×	
TbbLa10Ty	×	×		×	
TbPLA1d10Ty	×	×		×	
TbPLA1c10TyARNiTbPLA1c	×	×		×	×
Antat	néomycine	hygromycine	puromycine	blasticidine	phléomycine
KOTbPLA1c		×		×	
KOTbPLA1b			×	×	
1173KOTbPLA1c		×	×	×	
1173KOTbbLa		×	×	×	
1173KOTbPLA1cARNiTbbLa		×	×	×	×
1173KoTbPLA1cARNiTbPLA1d		×	×	×	×
1173KoTbbLaARNiTbPLA1d		×	×	×	×
1173TbPLA1c10Ty			×	×	
1173ARNiTbPLA1b			×		×
1173ARNITbPLA1a			×		×

Figure 38 : Les antibiotiques présents dans les mutants réalisés

1.3 Congélation parasites

Deux techniques de congélation ont été utilisées.

- Utilisation d'un milieu IMDM comprenant 7,5% de glycérol
- Utilisation d'une culture et ajout de 1/6^{ème} de glycérol 60%.

1.4 Expérience de secrétome

Pour obtenir les secrétômes des parasites, il est nécessaire de les mettre dans un milieu de culture favorisant la sécrétion de protéines (Proto et al. 2011). Ce milieu est un mélange 1:1 d'IMDM non complété en sérum et de Trypanosome dilution buffer (TDB). Ce TDB a pour formule : 20mM Na₂HPO₄, 80mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO₄, 20mM glucose, pH 7.4. Les parasites sont lavés en PBS afin de sortir toute trace de sérum puis repris dans ce milieu de dilution à une densité parasitaire très élevée.

On mettra 10^8 cellules pour 15 mL de milieu. Ces cellules sont comptées toutes les 30 minutes et observées au microscope afin d'observer la viabilité. Il est important que les cellules soient vivantes à la fin de l'expérience afin de discriminer le contenu parasitaire du sécrétome. Au bout de 3h30 (Proto et al. 2011), les parasites sont centrifugés, le milieu de culture est supplémenté en inhibiteurs de protéases et concentré afin d'être analysé en protéomique ou en western blot. Cette expérience a été mise au point à partir des expériences effectuées par Anne Geiger (Atyame Nten et al. 2010).

2 Culture des bactéries

2.1 Les lignées

2.1.1 Les bactéries pour le clonage

XL1-Blue est la souche de bactérie utilisée pour les clonages et les amplifications. Les bactéries transformées par un vecteur qui possède le gène de la β -lactamase (résistance à l'ampicilline), sont cultivées à 37°C en milieu liquide LB (Lennox Broth Base : 10g/L Bacto- tryptone, 5g/L extraits de levure, 10g/L de NaCl).

2.1.2 Les bactéries pour l'expression hétérologue

2.1.2.1 Les BL21 Star de Thermofisher

Les BL21 sont des cellules compétentes destinées aux applications nécessitant une expression de haut niveau des protéines recombinantes non toxiques à partir d'un faible nombre de copies. Les systèmes d'expression sont basés sur le promoteur T7. Elles contiennent un génotype qui favorise une haute stabilité d'ARNm et un haut débit de protéines. Elles ont pour résistance l'ampicilline.

2.1.2.2 Les Rosetta 2 de Novagen

Les Rosetta 2 sont des BL21 particulières qui permettent d'augmenter l'expression de protéines eucaryotiques qui contiennent des codons spécifiques qui sont rare chez les *E.Coli*. Elles sont donc utilisées pour les protéines dont le code génétique contient AGA, AGG, AUA, CUA, GGA, CCC, et CGG. Elles sont résistance au chloramphénicol.

2.2 Congélation bactéries

Les bactéries sont congelées dans un milieu composé de 1 :1 LB + Glycérol 50%.

3 Les différents extraits de parasites

Durant ma thèse, nous avons eu l'occasion de préparer différents extraits de parasites selon les expériences que nous souhaitions réaliser ensuite.

3.1 Préparation d'extraits protéiques pour gels d'électrophorèse

Les cellules sont lavées deux fois en PBS puis reprises dans une quantité de SDS 2% équivalent à $5 \cdot 10^6$ cellules pour 10 μ L. Des inhibiteurs de protéases Calbiochem® ont été rajoutés pour la conservation des extraits. Ces échantillons sont ensuite soniqués 5 fois 30 sec.

Ces extraits ont ensuite été repris dans une solution de Laemmli (Laemmli 1970) et bouillis 5 minutes afin de procéder aux dépôts colorés nécessaires à la réalisation des gels d'électrophorèses.

3.2 Préparation d'extraits protéiques pour le gel natif

Pour les extraits destinés aux gels natifs il était important d'utiliser une solution sans détergent pour ne pas dénaturer les protéines et leurs interactions. J'ai donc lavé les cellules avec du PBS deux fois, puis repris les extraits dans un tampon SoTe + 0,5% digitonine (0,6 M Sorbitol, 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCL pH 7,5).

3.3 Préparation d'extraits pour expérience d'activité

Pour tester l'activité des différents extraits protéiques, il est important de ne pas utiliser d'inhibiteurs de protéases. En effet les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les protéines par l'intermédiaire d'un site catalytique similaire à celui des lipases.

Par conséquent on ne peut imaginer utiliser un cocktail d'inhibiteurs de protéases sous peine d'éteindre l'activité présente dans nos échantillons. Afin d'être le plus neutre possible, les cellules sont donc reprises dans de l'eau stérile et soniquées 5 fois 30 secondes pour obtenir un mélange homogène.

3.4 Préparation d'extraits pour fractionnement à la digitonine

Les cellules qui doivent subir un traitement à la digitonine sont d'abord lavées deux fois en PBS puis reprises dans une solution d'extraction comportant ce détergent en concentration croissante. La digitonine est préparée dans du STE (tampon isotonique).

STE : 250 mM sucrose, 25 mM Tris-Hcl pH 7,4, 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT.

3.5 Préparation des extraits pour l'analyse lipidomique

Pour les extraits de parasites des expériences de lipidomique, les parasites sont lavés deux fois dans du TDB, puis repris dans 100uL de TDB et enfin resuspendus dans un mélange 2 :1 Methanol/ chloroforme.

Ces extraits sont ensuite agités pendant 4 h à 4°C afin de favoriser le passage des lipides du parasite dans la phase organique du mélange. La phase organique est récupérée et séchée sous azote gazeuse. Les échantillons contenus dans les tubes en verres contiennent les lipides extraits des parasites et peuvent être conservés à 4°C pendant plusieurs semaines.

4 Extraction et Dosage de l'Adn

L'ADN des parasites a été extrait à partir de cultures lavées deux fois en pbs puis reprises dans une solution de TELT puis de phénol-chloroforme. Après centrifugation, le surnageant est précipité dans de l'éthanol pur. Le culot d'ADN est lavé dans de l'éthanol et séché. L'ADN est ensuite repris dans une solution de TE contenant des RNAases.

5 Quantification des protéines

La quantification des protéines a été effectuée grâce à un test de Pierce 660-nm Protein Assay. Le complexe colorant-métal du test de Pierce 660 nm est brun rougeâtre et vire au vert lors de la liaison aux protéines. Le changement de couleur est produit par déprotonation du colorant à pH faible. Ce processus est facilité par des interactions avec des groupes d'acides aminés chargés positivement dans les protéines. Par conséquent, le colorant interagit principalement avec les résidus basiques dans les protéines, telles que l'histidine, l'arginine et la lysine et dans une moindre mesure la tyrosine, le tryptophane et la phénylalanine.

6 Utilisation du LAS et WB

Des extraits bruts de parasites sont préparés dans du SDS 2% à raison de $5 \cdot 10^6$ parasites pour 10 uL de dépôt. Ces extraits sont ensuite soniqués (5 cycles de 30 sec) puis bouillis pendant 5 minutes. Avant d'effectuer les dépôts, les échantillons sont repris dans du tampon de charge et la séparation est réalisée selon la technique classique décrite par Laemmli (Laemmli 1970). Après migration sur gel SDS-PAGE 4-20 %, les protéines sont transférées sur membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) par application d'un champ électrique (10 minutes). La membrane est ensuite bloquée dans une solution de PBS supplémentée de tween20 (0,05%) et de lait (5%) (PBSTL, solution de blocage)

pendant une heure. La membrane est alors incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du PBSTL. L'incubation doit durer au minimum une heure, mais peut s'effectuer durant une nuit complète à 4°C. Cet anticorps peut être conservé et réutilisé ensuite. Plusieurs lavages sont réalisés dans du PBSTL afin de décrocher les anticorps primaires fixés de manière non spécifique. Puis la membrane est incubée pendant 45 minutes avec les anticorps secondaires couplés à l'HRP (Horse Radish Peroxidase) dilués dans du PBSTL. La membrane est enfin lavée en PBS-Tween. Les complexes antigène- anticorps sont alors révélés par chimioluminescence grâce à l'ajout d'une solution de révélation contenant un oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), et le substrat chimioluminescent, le luminol, pendant 5 minutes (Biorad). En présence de peroxyde d'hydrogène, l'HRP oxyde le luminol qui émet de la lumière, cette réaction est analysée à l'aide d'un système d'imagerie numérique (ImageQuant LAS4000, GE Healthcare Life Sciences). La seule différence notable lors des expériences effectuées à St Andrews a été l'utilisation d'anticorps anti-souris et anti-lapins fluorescents, nécessitant un autre type d'appareil de lecture.

7 Expression et purification de protéines

7.1 Expression de TbPLA1b

TbPLA1b a été fusionnée à un tag GST sur sa partie N-Term et exprimée dans la bactérie *E.Coli* BL21star (ThermoFisher) grâce au vecteur d'expression pGEX4T1 (GE Healthcare). Incubées pendant 3h à 37°C avec ajout de 0,5mM d'IPTG, les bactéries sont ensuite centrifugées et resuspendues dans du PBS puis soniquées. Les billes « Glutathione Sepharose 4B » (Novagen) permettent ensuite de capter les protéines présentes dans la fraction soluble. La thrombine est utilisée pour séparer la protéine de son tag et une dialyse en PBS permet de concentrer et purifier la protéine. Cette protéine a été utilisée afin d'immuniser deux lapins dans les laboratoires Covalab. Nous avons ainsi obtenu des anticorps polyclonaux immunopurifiés très spécifiques, permettant la détection de la protéine à la fois par les techniques d'immunofluorescence et de Western blot.

7.2 Expression de TbPLA1c

TbPLA1c a été exprimée dans les cellules Rosetta 2 (Novagen) disponibles à St Andrew. Une version tronquée pour les 80 premiers acides aminés (peptide signal et domaine transmembranaire) a été clonée dans le pETSUMO (His-tag). Après transformation des

Rosetta 2 sont cultivées dans un milieu d'auto-induction pendant 4 jours à 16°C. Les cellules sont ensuite centrifugées et soniquées dans un tampon K₂HPO₄ à PH7 (50 mM K₂HPO₄, 100 mM KCl, 10 mM imidazole, 400 mM, 270 NaCl, 10% Glycerol, 0.5% Triton X-100) selon le protocole du Dr. Belaunzarán (María Laura Belaunzarán et al. 2013). Une centrifugation à 5000g pendant 30 min à 4 °C est nécessaire pour séparer la fraction soluble de celle non soluble. Une colonne His-Trap (Dutscher) permet de capturer la protéine présente dans la fraction soluble et un gradient d'imidazole permet de la décrocher et de la purifier.

8 Modification génétique des parasites

La modification génétique des parasites passe par des préparations préalables de biologie moléculaire. En effet, afin de transférer les parasites et changer leur génome il est important de construire des segments d'ADN qui pourront remplacer, annuler ou compléter les fonctions des gènes ciblés.

Pour cela je décrirai en premier lieu les différentes étapes de la construction de l'ADN à transférer et j'apporterai en second les différents primers utilisés.

8.1 Vecteur pLEW100

Ce vecteur navette (*E.coli* et *Tbb*) est utilisé pour l'expression de gènes d'intérêt dans les formes sanguines de *Trypanosoma brucei brucei*. Il contient les gènes de résistance pour l'ampicilline et la phléomycine (Wirtz et al. 1999). Le fragment d'intérêt est inséré entre des sites de restrictions uniques sous la dépendance d'un promoteur fort suivi de l'opérateur tétracycline.

Les trypanosomes sont transfectés avec ce vecteur, préalablement linéarisé par *NotI* qui coupe au milieu de la région rDNA spacer afin de cibler l'intégration du vecteur en aval du locus des gènes ribosomiaux par recombinaison homologue.

8.2 PCR " Touch down "

La PCR " Touch down " est comparable à une PCR classique pour les cycles de dénaturation, d'hybridation et d'élongation. La différence va survenir dans les 5 premiers cycles du programme où une descente progressive de la température d'hybridation (ou " touch down ") est réalisée (62, 61, 60, 59, 58°C) puis cette température est stabilisée (57°C) pour le reste des cycles. Les conditions deviennent

progressivement moins stringentes, permettant ainsi une meilleure spécificité des amplifiats obtenus. La liste des primers utilisés pour les PCR dans le cadre de l'ARN interférence, se trouve Figure 39.

Gène candidat	Région	Primers	Enzymes de restriction
TbbLa			
sens	5p	GCAAGCTTATGGAGAGGAGACAGGCCGGG	HINDIII
	3p	GCCTCGAGATAAAAAGCAAATACACCGC	XHOI
anti-sens	5p	GCAAGCTTGAACCTCGAGTAATAGAGGGCAAGGATTGC	HINDIII/XHOI
	3p	GCTCTAGAATGGAGAGGAGACAGGCCGGG	XBA
TbPLA1d			
sens	5p	GCAAGCTTATGAGTGAGCGGAAAGGCAA	HINDIII
	3p	GCCTCGAGAGCTCGCGTTGGGGTATGGA	XHOI
anti-sens	5p	GCAAGCTTGAACCTCGAGAAGTGACTCGAAAGCATCGA	HINDIII/XHOI
	3p	GCTCTAGAATGAGTGAGCGGAAAGGCAA	XBA
TbPLA1c			
sens	5p	GCAAGCTTATGGTAACGTGGGCGCTGAA	HINDIII
	3p	GCCTCGAGGAAAACGGTCATCTCCAAAC	XHO
anti-sens	5p	GCAAGCTTGAACCTCGAGATCCCTTATGAAGAAAATG	HINDIII/XHOI
	3p	GCTCTAGAATGGTAACGTGGGCGCTGAA	XBA
TbPLA1a			
sens	5p	GCAAGCTTATGTCGGAACCCGTTGATCA	HINDIII
	3p	GCCTCGAGCGCCAAGCGAATGCCCCGTG	XHO
anti-sens	5p	GCAAGCTTGAACCTCGAGTGGTAATGGCGGGAGCGCCGG	HINDIII/XHOI
	3p	GCTCTAGAATGTCGGAACCCGTTGATCA	XBA

Figure 39 : Primers utilisés pour les ARN interférences dans le pLew 100

8.3 Le principe de l'ARN interférence

Un ARN double brin est pris en charge par le complexe DICER, aussi appelé « l'éminceuse », qui le clive en petits brins de 21 à 25 pb. Ces petits ARN interférence (siARN) sont transférés sur le complexe RISC qui dégrade un brin dit « brin passager » et conserve le brin guide, qui le dirige vers un ARNm de complémentarité parfaite avec le siARN. Cette association RISC/ARNm induit un clivage à l'endroit complémentaire et une dégradation de l'ARNm, diminuant d'autant son expression et la traduction en protéines (Figure 40).

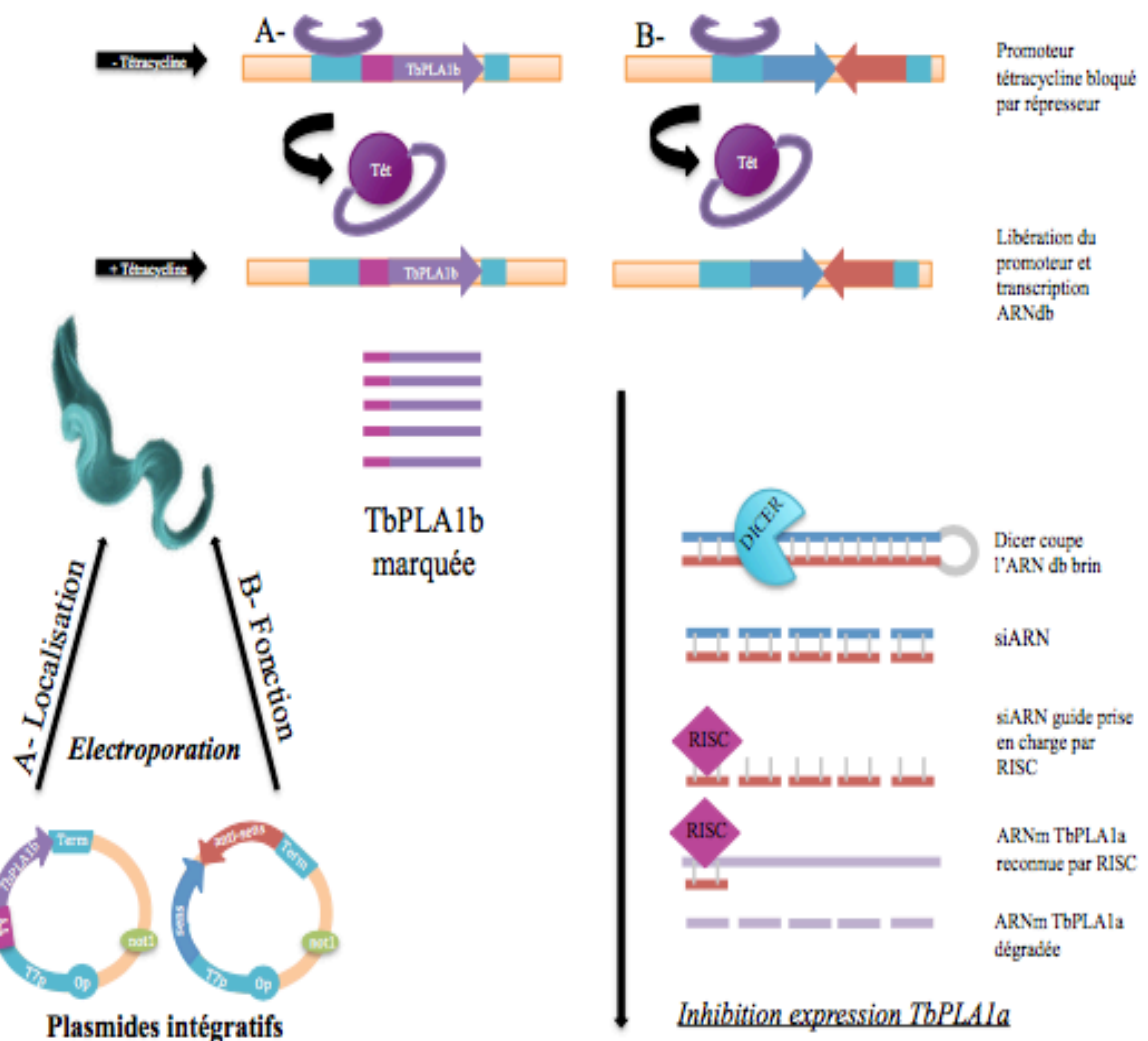


Figure 40 : Principe de l'ARN interférence

Ce schéma représente la stratégie employée afin de réintégrer une protéine taguée en N-terminal sur la partie A de la figure et le principe de l'ARN interférence sur la partie B. Le même plasmide est utilisé et nous aurons une expression de l'ADN dépendante de la présence de tétracycline. Quand la tétracycline est présente, elle libère le promoteur qui se retrouve disponible pour transcrire l'ADN. L'exemple ici était le Knock-down de la TbPLA1a dans le contexte de cellules KOTbPLA1b.

8.4 Clonage

Les fragments de PCR sont séparés sur gel d'agarose 1% puis extraits grâce au kit " Nucleobond " (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les ligations sont réalisées avec 100ng de vecteurs digérés et une quantité équivalente d'inserts également digérés en présence de ligase pendant 2 heures à température ambiante.

8.5 Transformation des bactéries XL1-Blue :

Les bactéries et le mélange de ligation (plasmide / insert) sont incubés pendant 30 minutes dans la glace puis subissent un choc thermique : 30 secondes à 42°C et 2 minutes dans la glace. Ces bactéries sont placées dans du LB sous agitation à 37°C pendant une heure. Elles sont ensuite étalées sur milieu gélosé contenant de l'ampicilline et placées une nuit à 37°C.

9 Transfection des parasites

L'ADN est linéarisé, précipité et resuspendu dans de l'eau stérile (10µg dans 10µl d'eau). 1.10^7 cellules sont centrifugées, le culot est repris dans 100µl de solution Amaxa Parasitic 2 (Lonza Amaxa Basic Parasite Nucleofector) et mis en contact avec l'ADN. L'électroporation est réalisée en utilisant le programme X-001 (Amaxa Nucleofector). Puis les cellules sont diluées dans le milieu de culture, et l'antibiotique de sélection n'est ajouté que 24h après afin de permettre aux cellules de recommencer à se diviser. Il faudra attendre environ 7 jours pour que les premiers clones de formes sanguines apparaissent.

10 Insertion de tag directement au locus d'un gène : tag in situ

Les techniques de tag *in situ* (ou endotagging) sont utilisées afin de visualiser les protéines selon leur expression endogène, c'est à dire au locus du gène. Il n'y aura donc pas de surexpression de la protéine comme lorsque l'on induit l'expression d'une protéine dans un vecteur comportant un promoteur fort, comme le pLew 100. Les deux plasmides utilisés, le pPotv2 et le pPotv7, ont été mis au point par Samuel Dean (Dean et al. 2015) et sont couramment utilisés au laboratoire pour tagger les protéines (Figure 41). Cependant la présence de tag pourrait avoir une influence sur la conformation ou l'adressage de la protéine que l'on étudie. Ainsi par exemple, quand un peptide signal est identifié en N-ter, il apparaît judicieux d'insérer le tag en C-ter. Pour construire les primers des endotagging (Figure 42) il est nécessaire d'utiliser la région UTR du gène. Ces longs primers permettent une recombinaison homologue avec intégration d'une cassette de résistance à un antibiotique.

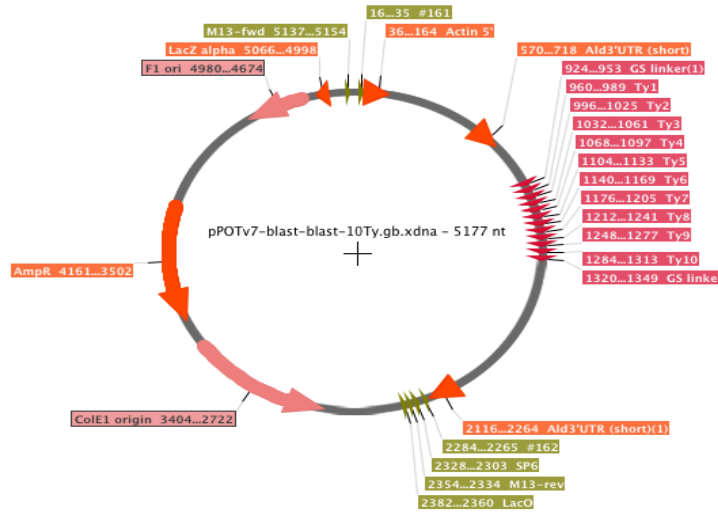


Figure 41 : Représentation schématique du pPotV7 avec 10TyTag

Gène candidat	Région	Primers
TbbLa pPOTV7		
	Cterm	5p ACACATCCTGCAAGATACGTGCTTCCGGCGATCCAGAGCGTCATATGTGGCCGAGCCTGGACGCGAGCCGGATGCCATGGGTTCTGGTAGTGGTTCC
		3p AGCCGCACACTTTTATCCACGCCTTCCCTTCTTTCATCCGCACGCGAATGCATTCGCAACCCAAAGGCCAGGAACAACCCAATTTGAGAGACCTGTGC
	Nterm	5p TTGCATTCCGTCAAGTACTGAGGTTGTTTTTTTTTCTCCGGAGACGGAACTCAGAAGGGAGGCCAGAGCCATCGAGGTATAATGCAGACCTGCTGC
		3p TCAGCTGGAAGGTCGTTACGTGCACTGATGCAGAATTCATAGAGTCCAGCAAAATCCACCCCGCCTGTCTCCTCTCCATACTACCCGATCCTGATCC
		ppotV2 Nterm
TbPLA1c pPOTV2 Nterm		
	Nterm	5p TTTCGAATATAAAAATAAATAGAGTTGTGAGCAGTTTCTTCGCGTTTGGCGTATATTTTGGCTTACTTCTGTGGTGTGTGTGTATAATGCAGACCTGCTGC
		3p GGCCGTGTGGCCAAATAGGAATGCTTCTGTGACCATCGGACTACGGCAACAAAATACTTCAGCGCCACGTTACCATCTGTACAGCTCGTCCATGC
TbPLA1c pPOTV7		
	Cterm	5p TTTCGAATATAAAAATAAATAGAGTTGTGAGCAGTTTCTTCGCGTTTGGCGTATATTTTGGCTTACTTCTGTGGTGTGTGTGTATAATGCAGACCTGCTGC
		3p GGCCGTGTGGCCAAATAGGAATGCTTCTGTGACCATCGGACTACGGCAACAAAATACTTCAGCGCCACGTTACCATACTACCCGATCCTGATCC
TbPLA1c Congo		
	Nterm	5p TTTCGAATATAAAAATAAATAGAGTTGTGAGCAGTTTCTTCGCGTTTGGCGTATATTTTGGCTTACTTCTGTGGTGTGTGTGTATAATGCAGACCTGCTGC
		3p GGCCGTGTGGCCAAATAGGAATGCTTCTGTGACCATCGGACTACGGCAACAAAATACTTCAGCGCCACGTTACCATACTACCCGATCCTGATCC

Figure 42: Primers utilisés pour les expériences d'endotagging ou de KO

11 Délétion de gènes par Knock-out (KO)

Les délétions des gènes d'intérêt ont été réalisées soit par ajout de plasmides spécifiques permettant une recombinaison au locus, soit par l'utilisation des fragments de PCR avec les primers spécifiques 5'Nter et 3'Cter des différents endotagging.

Nous avons, lors de ma thèse, développé cette approche jusque-là peu utilisée au laboratoire afin de s'affranchir des étapes de sélection bactérienne et de vérification de

plasmides, permettant un gain de temps considérable. Pour cette technique, seules deux PCR suffisent puis une transfection.

12 Immunofluorescence indirecte

Les parasites sont amplifiés puis centrifugés (10 minutes à 500g). Après deux lavages en PBS-glucose tiède, les cellules sont reprises dans du PBS et fixés avec du paraformaldéhyde 3%. L'ajout de glycine permet de stopper la réaction. Les cellules sont ensuite diluées dans du PBS et centrifugées 5 minutes à 500g. Le culot est lavé deux fois en PBS et repris dans un petit volume de PBS. Ces parasites sont déposés sur une lame préalablement dégraissée et fractionnée en puits. L'excédant de liquide est retiré et les cellules sont ensuite perméabilisées à l'aide de PBS-triton 0,05%. Cette incubation est brève (3 minutes) et nécessite ensuite plusieurs lavages en PBS par puits. Les lames sont bloquées en PBS-BSA 4% pendant 1 heure. L'anticorps primaire est dilué dans la solution de blocage et incubé pendant une heure. L'anti-TY est dilué au 1/250^{ème} et les anticorps anti-aldolase et anti-énolase sont dilués au 1/1000. Trois lavages consécutifs en PBS sont nécessaires pour se débarrasser de l'excédant d'anticorps et décrocher des parasites les liaisons non spécifiques. L'anticorps secondaire (couplé à un fluorophore) est dilué dans la solution de blocage et est mis en contact avec les lames pendant 45 minutes. L'anti-souris Alexa Fluor® rouge est dilué au 1/500^{ème}, tandis que l'anti-lapin Alexa Fluor® vert, est dilué au 1/1500^{ème}. Trois lavages supplémentaires sont effectués avant d'ajouter le DAPI pendant 3 minutes. La lame est enfin lavée avant d'être montée. Les parasites sont visualisés avec un microscope imager Z1 à l'objectif x63. Les images sont traitées avec le logiciel ImageJ.

13 Perméabilisation des membranes à la digitonine

Les trypanosomes sont lavés deux fois en PBS et resuspendus en tampon STE (250 mM sucrose, 25 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) supplémenté de 150 mM NaCl, 1 mM dithiothréitol et d'inhibiteurs de protéase (Protease Inhibitor Cocktail Set III, EDTA-free-Calbiochem) de manière à obtenir un mg de protéines par ml de tampon. La quantité de protéines a été dosée à l'aide du réactif Pierce 660nm (Thermo Scientific). Des aliquots sont incubés avec des concentrations croissantes de digitonine pendant 4 minutes à 25°C avant d'être centrifugés 2 minutes à 13000 g. Les fractions solubles sont prélevées

tandis que les culots (fractions insolubles) sont repris dans du SDS 2%. Les échantillons (culots et fractions solubles) sont analysés ou congelés à -20°C.

14 Lyse osmotique

1.10^8 cellules ont subi une lyse osmotique en étant incubées 30 minutes à 4°C avec un tampon hypotonique (5mM Na₂HPO₄, 0,3mM KH₂PO₄). Ce tampon permet l'éclatement cellulaire et la séparation du contenu cytoplasmique des composants membranaires du trypanosome. Les cellules sont ensuite centrifugées à 15000 rpm pendant 15 minutes. Le surnageant est conservé et le culot est traité de la même façon que précédemment à deux reprises. Nous avons donc à la fin de la manipulation un culot repris en SDS2% et trois surnageants de lyse.

15 Sécrétion des protéines

1.10^8 parasites sont centrifugés, lavés dans du TDB (Trypanosome Dilution buffer, 20mM Na₂HPO₄, 80 mM NaCl, 5mM KCL, 1mM MgSO₄, 20mM glucose, pH 7,4) et incubés pendant 3h30 à 37°C dans du milieu de sécrétion (7,5 mL de TDB et 7,5 mL de milieu IMDM sans sérum) (Proto et al. 2011). Après incubation, les parasites sont centrifugés à 1800 rpm et le surnageant est séparé des culots. Les culots sont repris dans du SDS 2% puis soniqués (5 cycles de 30 sec) alors que les surnageant sont filtrés (0,45µm). Le surnageant est supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Calbiochem) puis concentré 50 fois par centrifugation sur des colonnes d'exclusion de taille (PierceTM Protein Concentrator PES, 10K MWCO). Ces échantillons sont ensuite analysés par Western blot.

16 Détection d'activités phospholipase

16.1 Utilisation de kits commerciaux

Les activités phospholipase sont mesurées grâce aux kits commerciaux EnzCheck® PLA1 (Figure 43) et PLA2 (Figure 44) (Life technology) selon les indications du fournisseur. L'échantillon et le substrat fluorescent sont mélangés à un ratio 1:1 et la fluorescence est mesurée pendant 2 h 30 à l'aide d'un fluorimètre (FLUOstar Omega, BMG Biotech). La phospholipase hydrolyse l'ester spécifique du substrat du kit et libère le fluorophore détectable.

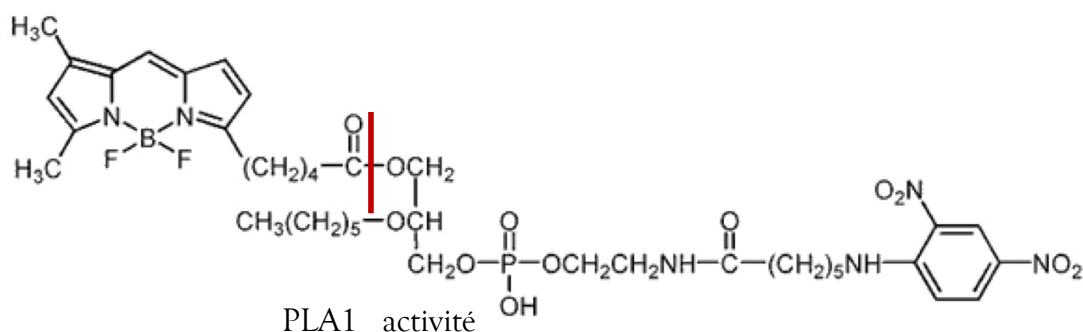


Figure 43 : Substrat du kit Enzcheck® PLA1

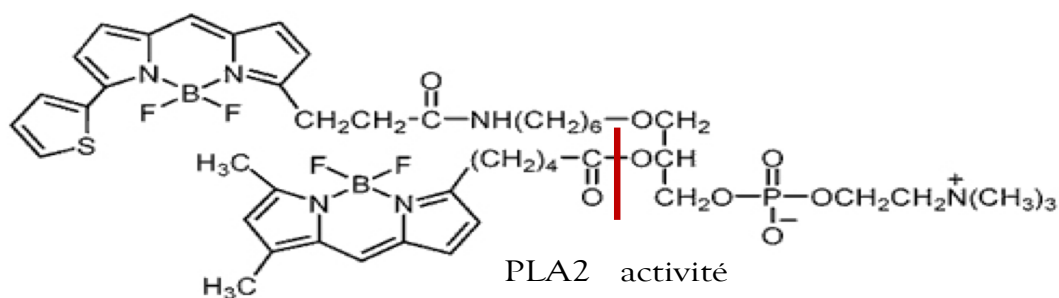


Figure 44 : Substrat du kit Enzcheck® PLA2

16.2 Analyses de lipidomique

16.2.1 Analyse globale lipidique des échantillons

Les analyses de lipidomiques ont été effectuées à l'université de St Andrews et avaient pour objectif de rechercher le substrat préférentiel des différents candidats lipase.

Les échantillons ont été préparés comme décrit plus haut. Avant d'injecter les échantillons dans le spectromètre de masse à nanospray, il est important de les reprendre dans une solution de méthanol, chloroforme (1:2), combiné à égalité avec une

solution d'isopropanol, d'eau et d'acétonitrile (7 :2 :6). Après avoir vortexé les extraits, les lipides, repris de manière homogène, peuvent être injectés dans le spectromètre à nanospray qui produira des spectres que nous pouvons analyser avec la base de données LipidMaps. Juste avant d'extraire les lipides, on peut rajouter un étalon interne, le SPLASH Lipidomix® de Avanti qui montre la qualité de l'extraction et permet d'introduire des données semi quantitative à notre analyse lipidique.

16.2.2 Analyse de l'activité lipase

L'objectif de cette expérience était de mettre en contact une lipase avec un lysat de parasite afin d'observer quels lipides particuliers cette lipase peut lyser. Les parasites lavés dans du TDB sont repris dans de l'eau stérile et soniqués. 100uL d'une enzyme purifiée est ajouté à 100 uL de lysat parasitaire. Après une incubation de 12 heures à 25°C, les lipides sont extraits et séchés. Les spectres obtenus sont différents selon l'activité de l'enzyme ajoutée. Le contrôle positif se fait par ajout de 25 uL de PLA2 de pancréas de bœuf et le contrôle négatif avec ajout de PBS.

Chapitre 3 : Résultats et Discussions

Les résultats de mon projet de thèse vont se décliner en plusieurs parties. L'objectif était d'étudier les protéines les unes après les autres et de réaliser des combinaisons de mutants. Les doubles mutants, pour lesquels deux lipases ont été délétées ont été analysés dans des études de croissance et des études d'activité. Une stratégie globale montrant les différentes techniques utilisées, à la fois ciblées et globales a été schématisée dans la Figure 45.

1 TbPLA1b

La TbPLA1b est le premier candidat à activité lipase que nous avons étudié au laboratoire. Une partie des résultats de l'étude de cette protéine a permis la soumission d'un article scientifique (ci-après) tandis qu'une autre partie des résultats nécessite toujours d'être exploitée. Nous vous présenterons en premier lieu l'article scientifique puis nous ajouterons les données complémentaires en cours d'étude au laboratoire.

1.1 L'article scientifique

Cet article soumis et en cours de révisions, s'est focalisé sur la localisation de la protéine et son éventuelle participation à la virulence du parasite.

Bref résumé de ces résultats :

- Nous avons d'abord effectué des expériences de localisation à l'aide d'une réexpression de protéines marquées en N-term par un épitope Ty. Nous avons pu montrer une bi-compartmentalisation de la protéine à la fois dans le glycosome et dans le cytosol dépendante du signal SKS en C-term de la protéine (PTS1-like) et sa sécrétion dans le milieu extracellulaire.
- Nous avons mis en évidence l'apparition d'anticorps contre TbPLA1b dans les souris infectées par le *Trypanosoma brucei brucei*.
- La TbPLA1b possède une activité PLA1 d'après les résultats d'un kit enzymatique EnzCheck, spécifique de l'activité PLA1.
- La réalisation d'un Knock-Out du gène montre que cette protéine n'est pas essentielle à la survie du parasite.
- Des analyses *in vitro* sur des souris ne montrent pas une virulence diminuée des parasites privés de TbPLA1b, donc nous avons conclu que TbPLA1b n'était pas directement liée à la virulence du parasite.

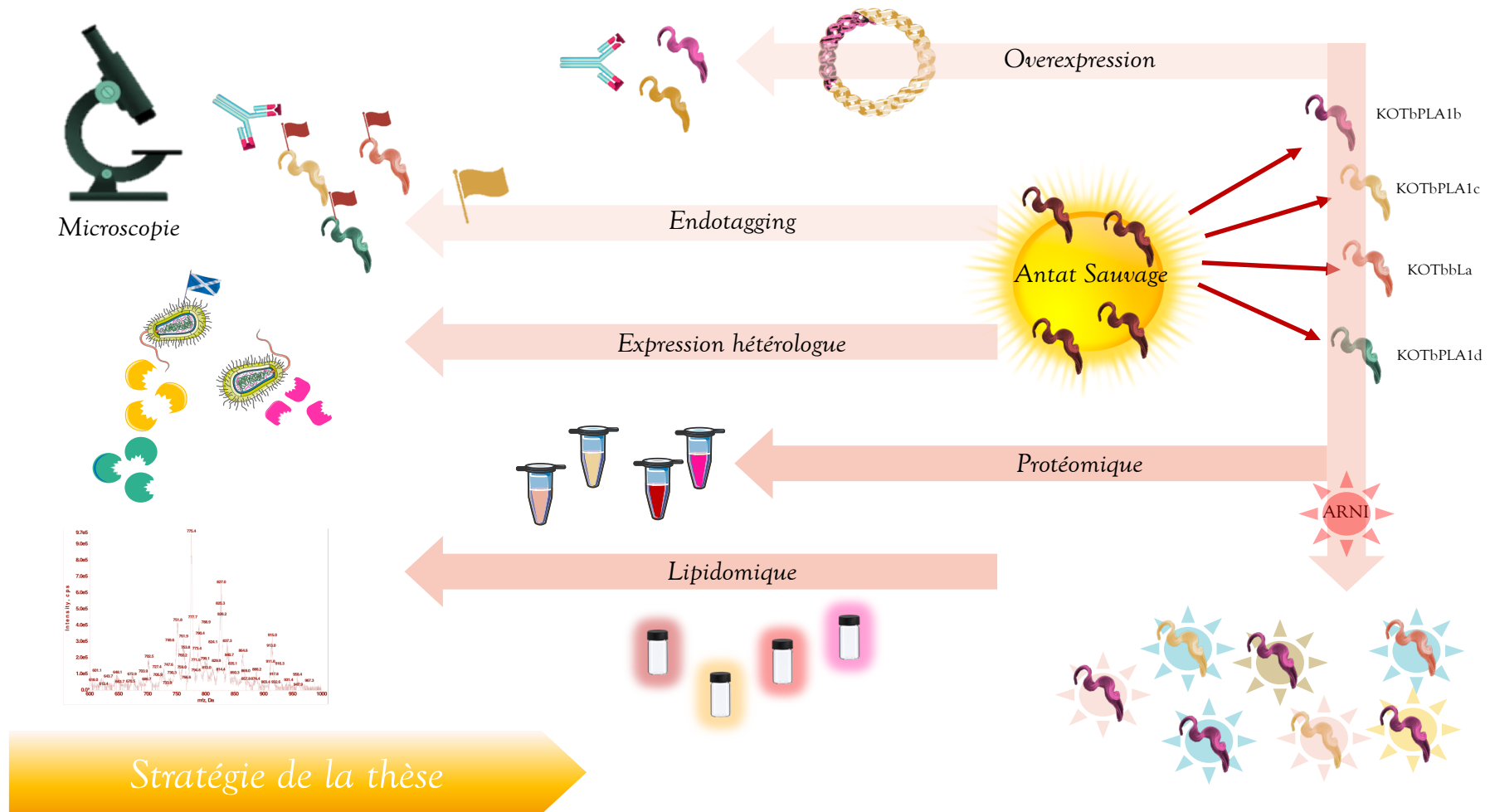


Figure 45 : Stratégie expérimentale de l'étude des phospholipases du trypanosome africain

Les Antat sauvages vont subir des manipulations génétiques de Knock Out et de Knock Down afin d'étudier la survie des parasites dans différentes conditions. Des protéines seront surexprimées ou endotagguées afin de déterminer la localisation des candidats. A partir d'ADN parasitaire, des bactéries serviront à l'expression hétérologue des protéines. Des extraits totaux des divers mutants seront utilisés pour des analyses de protéomique et de lipidomique.

A novel phospholipase with dual localisation in *Trypanosoma brucei*

Monic S¹, Lamy A¹, Thonnus M¹, Bizarra-Rebelo T², Bringaud F¹, Figueiredo LM² and Rivière L¹.

¹ Laboratoire de Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité (MFP), Université de Bordeaux, CNRS UMR-5234, Bordeaux, France

² Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

Abstract

Phospholipases are esterases involved in lipid catabolism. In pathogenic microorganisms (bacteria, fungi, parasites) they play a critical role in virulence and pathogenicity. A few phospholipases (PL) have been characterised so far at the gene and protein level in unicellular parasites including African trypanosomes (AT). They could play a role in different processes such as host-pathogen interaction, antigenic variation, intermediary metabolism. By mining the genome database of AT we found a putative new PL candidate genes and we provided biochemical evidence that the enzyme has a phospholipase A1 activity. This protein has a unique non-canonical glycosome targeting signal responsible for its dual localisation in the cytosol and the peroxysomes-related organelles named glycosomes. We also show that this new phospholipase is excreted by these pathogens and that antibodies directed against this protein are generated during an experimental infection with *T. brucei gambiense*, a subspecies responsible for infection in humans. This feature makes this enzyme a possible tool for diagnosis.

Introduction

Trypanosomatids are protozoa transmitted by insect vectors and cause human and animal diseases. The three main species are American trypanosomes (*T. cruzi*, Chagas disease), *Leishmania spp* (cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis) and African trypanosomes (*T. brucei*, sleeping sickness). Millions of people are affected by these diseases and more than half a billion are at risk (World Health Organization). From a veterinary point of view, some trypanosomes species are particularly virulent on farm animals, especially in Africa where this leads to heavy economic losses and it constitutes a major obstacle to the development of this continent^{1,2}.

Phospholipases (PLs) belong to a complex group of enzymes that cleave phospholipids. They are classified as A1, A2, B, C or D depending on the site of hydrolysis³. They have a variety of biological functions including production of bioactive lipids that act as second messengers and modulators of the immune response^{4,5}. Some PLs are involved in the recycling of membrane phospholipids and others have cytolytic effects. Noteworthy, PLs are powerful toxins found in the venom of bees and snakes and trigger blood and necrotic damage^{6,7}.

In several pathogens (*Pseudomonas*, *Rickettsia*, *Candida*, *Amoeba*, *Giardia*, *Toxoplasma* and others) phospholipases play a role in the infection and have been recognised as true virulence and pathogenic factors^{8,9}.

Phospholipases A1 (PLA1) activities are capable of hydrolyzing the sn-1 acyl ester function of the phospholipids. In protozoan parasites, only a few genes encoding PLA1 have been cloned and studied so far^{10,11}. In higher eukaryotes, classification of PLA1s does not rely on sequence similarity, but rather on subcellular localisation. Indeed PLA1s can be divided into two groups, the first group includes excreted enzymes, while the second one contains intracellular enzymes^{10,12}.

Based on the literature and genomic data, kinetoplastids possess several proteins with putative PLA1 activity among which a few have been already experimentally described. In *T. cruzi*, a parasite with a predominantly intracellular lifestyle, the only known PLA1 is a membrane-bound and excreted protein that alters the lipid profile of the host *via* second messenger production and concomitant activation of protein kinase C¹³. *Leishmania spp* possess also a PLA1 that could be involved in virulence¹⁴ It has been demonstrated that the pathogens *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma congolense* possess a higher PLA1 activity than the non-pathogen *Trypanosoma lewisi*¹⁵.

Moreover, in *T. brucei* mammalian forms (bloodstream form-BSF) the PLA1 activity is higher than in insect forms¹⁶. Finally, a strong PLA1 activity has been measured specifically in tissue fluids of *T. brucei*-infected rabbits and this activity positively varies according to the waves of parasitemia¹⁷. Altogether this suggests that PLA1 could play an important role in the host-pathogen interaction.

So far, only one phospholipase gene has been described and studied in *T. brucei*. It encodes a cytosolic protein with PLA1 activity, which is involved in the synthesis of lyso-phosphatidylcholine (Lyso-PC) metabolites¹⁸. This protein was named TbPLA1 by the authors. TbPLA1 is not excreted and is neither essential for *in vitro* growth of both parasite stages (Insect and bloodstream stages), nor for *in vivo* virulence^{18,19}. Although the trypanosome genome contains a number of genes that could encode putative phospholipases (our unpublished work), those responsible for PLA1 activity are unknown.

In this study we describe a novel *T. brucei* phospholipase harboring a PLA1 activity *in vitro* and our analysis showed that this protein is not only distributed in both glycosomes and cytosol but is also excreted in the medium. We discuss the potential roles played by PLA1 in trypanosomes and its interaction with the host.

Results

In silico identification of a new putative phospholipase in Trypanosoma brucei.

Previous studies strongly suggested the existence of more than one phospholipase in African trypanosomes playing important role(s) in host-pathogen interaction^{10,11}. Our goal was to identify such new phospholipase(s) in *T. brucei*. We rationalised our research by combining an *in silico* analysis with a literature analysis, including global approaches described below. We found a gene, Tb927.8.6390 (GeneDB accession number), with a predicted α/β hydrolase / phospholipase domain²⁰ and annotated as TbLysoPLA. According to the literature^{21,22} this gene encodes for a protein located in the glycosomes which are peroxisome-like organelles²³ and also is possibly excreted/secreted²⁴. Moreover, based on the previously published RNAi screen (performed by Alsford & al²⁵), the gene seems to be essential in BSF. Orthologs of Tb927.8.6390 in other kinetoplastids have a very good general conservation of the amino acid sequence (for example 53% identities with *leishmania* and 70% identities with *T.congolense*) (Figure 1A and table S1) in which two elements are easily recognisable. First, the putative active site typical of phospholipases (GX SXG, ²⁶) is perfectly conserved in all these organisms (Figure 1, box1), confirming that the protein should have a phospholipase activity. Then, the carboxy-terminal end is not conserved (Figure 1, box2). For a protein to be imported into the glycosomes, it must have a specific targeting signal such as the canonical Peroxisome-Targeting Signal 1 (PTS1) which is a tripeptide (S/A/C)(K/R/H)(L/M) found in the C-terminus²⁷. As mentioned above, Tb427.08.6390 has been detected in glycosomes in several mass-spectrometry analysis^{21,22} and this localisation could be due to the tripeptide “SKS” at the extreme C-terminus. This sequence does not correspond strictly to a canonical PTS1 and has not been observed as a PTS1 in other kinetoplastid species. Since the “SKS” is unusual, we searched in the TriTryp genomic database for other *T. brucei* encoded proteins that possess the same motif. The table presented in Figure 1B shows that two other proteins contain this C-terminal tripeptide. The transmembrane adaptor Erv26 is found in COPII vesicles²⁸ and CIF1 is located at the cell tip²⁹.

Tb927.8.6390 encodes for a protein with phospholipase A1 activity

Based on sequence homology, Tb927.8.6390 has been annotated as a phospholipase. To experimentally confirm this enzymatic activity, the purified recombinant protein expressed in *E. coli* (Figure 2A and S1) was tested for phospholipase activity using an *in vitro* fluorogenic assay (figure 2A). In this assay, PLA1 releases the fluorophore from the Fluorogenic PED-A1 (glycerophosphatidylethanolamine with dye-labeled sn1 chains). We could detect a phospholipase A1 activity with our recombinant enzyme (Figure 2A, left) but neither PLA2 nor PLC activity (not shown). We have also expressed and purified a mutated version in which the putative serine (S¹⁷¹) of the active site has been replaced by an alanine (PLA1b^{S171A}). PLA1b^{S171A} has no phospholipase A1 activity (Figure 2A, right) confirming the function of this enzyme and the requirement of this amino acid in the active site.

Tb927.8.6390 is therefore the second enzyme with phospholipase A1 activity described in *T. brucei*. The first (Tb927.1.4830) has been described by Richmond and Smith^{18,19}. For convenience Tb427.08.6390 was named TbPLA1b, and we propose to rename Tb427.01.4830 TbPLA1a.

TbPLA1b is constitutively expressed

The purified recombinant TbPLA1b described before was used to immunize Rabbits in order to raise a specific anti-serum (See materials and methods). This immune serum recognises a single 30 kDa-protein corresponding to the size predicted in Trityp database (Figure 2B, left). This signal is detected in both Bloodstream and procyclic cultivated stages indicating that this enzyme is constitutively expressed. As observed in the figure only one protein could be detected by the polyclonal serum, and we could not detect any signal neither in the pre-immune serum nor cell-lines depleted of TbPLA1b showing the specificity of our antibody. Previous analysis suggested that anti-TbPLA1 could cross-react with TcPLA1 even if the sequences are not well-conserved¹³. TbPLA1b and the PLA1 from Tb, Tc and Lm are also showing a low level of amino-acids identity (FigS2 A and B). As shown in figure S2 our antibody could detect the ortholog of TbPLA1b in *Leishmania*. As a control, anti-TbPLA1a did not give any signal with *Leishmania* extract while detection remained possible in the cell-line depleted of TbPLA1b. Altogether these results (figure2 and figure S2) show that our

antibody is highly specific and do not cross-react with the PLA1 already described by Richmond and al.

TbPLA1b is not essential for the survival of parasites in vitro and in vivo

According to the RITseq screen performed by Alsford & al²⁵, TbPLA1b appears to be essential for the BSF, making it a target for a possible treatment. In order to verify these results, expression of this protein was conditionally down-regulated by RNAi in the presence of tetracycline³⁰. As shown in Figure 2B (middle), inhibition of PLA1b expression in three tetracycline-induced^{RNAi}TbPLA1b cell lines has no impact on the parasite growth *in vitro* although PLA1b is no more detectable by Western blot (Figure 2B). Since residual amounts of the targeted protein can be expressed in RNAi cell lines, both alleles of the TbPLA1b gene were deleted by gene replacement (Δ TbPLA1b, Figure 2B, right panel, fig sup). The Δ TbPLA1b mutant showed no growth defect (not shown) confirming that PLA1b is not essential for BSF *in vitro*.

In order to test the importance of TbPLA1b for parasite survival in the mammalian host, mice were infected with the Δ TbPLA1b strain or the parental line. If TbPLA1b is essential for the establishment of infection, we expected a decrease in the number of null-mutant parasites in the blood and organs. Both WT and Δ TbPLA1b parasites show similar levels of parasitemia (Figure 2C). On day 5, parasitemia reached $> 10^8$ parasites and mice were sacrificed. On this day, solid tissues were collected to count the total number of parasites by qPCR. We observed that the total number of WT parasites in the solid tissues was very high in three tissues analysed (heart, kidney and adipose tissue), which is probably a consequence of the uncontrolled parasitemia that stems from lack of pleomorphism of Lister427 strain. In any case, we observed no statistically significant differences in parasite load between WT and Δ TbPLA1b parasites in any tissue, indicating that TbPLA1b is not necessary for parasite survival (Figure 2C) and growth in any of the tested tissues *in vivo*.

Overall, we conclude that TbPLA1b is not essential for the viability of the strain Lister427 neither *in vitro* nor *in vivo*.

Tb PLA1b localizes in the glycosomes and the cytosol

Several proteomic studies suggested that TbPLA1b is a glycosomal protein^{21,22}, which is consistent with the presence of a signal PTS1-like signal at the C-ter extremity. We used a digitonin titration experiment to determine the localisation of the protein. In this approach the parasite membranes are differentially permeabilized using increasing concentrations of this detergent³¹. Western Blot analysis of the soluble fractions using our specific anti-TbPLA1b shows that this protein is released together with the enolase, a cytosolic marker (Figure 3A,³²). The analysis of the insoluble fractions shows that the profile of TbPLA1b is similar to that of aldolase, a glycosomal marker (Figure 3A,³²). These results indicate that TbPLA1b is distributed in both the glycosomes and the cytosol of BSFs. This is in contrast to previously published describing PLA1b only as a glycosomal protein^{21,22}.

A peculiar PTS-1 signal allows dual localisation.

The analysis of the primary sequence shows a C-terminal signal close to PTS1, “SKS” which is specific for this protein. We hypothesized that this PTS1-like signal could be important for the subcellular localisation of TbPL1Ab. The strategy was to express different mutant versions of TY-tagged TbPLA1b in the Δ TbPLA1b genetic background to study the distribution of the overexpressed proteins, upon biochemical fractionation and immunofluorescence analyses³³. To validate our approach the TY-tagged TbPLA1b protein expressed in the TbPLA1b-null background showed the same distribution of TbPLA1b as the native TbPLA1b detected with the anti-PLA1b antibodies in the wildtype context (Figure 3B, left panel). The upper band corresponds to the Ty-tagged protein and the lower band to the wild-type protein. This result is confirmed by hypotonic lysis fractionation (3B, middle) and by immunofluorescence analyses (3B, right). To determine the possible role of the PTS1-like SKS motif in the partial glycosomal localisation of TbPLA1b, the SKS motif was removed (TbPLA1b^{noSKS}NTy) or replaced by a canonical PTS1 motif (TbPLA1b^{SKL}NTy) and the recombinant TY-tagged proteins expressed in the Δ TbPLA1b background ((Δ TbPLA1b-TbPLA1b^{SKS}NTy and (Δ TbPLA1b-TbPLA1b^{SKL}NTy respectively). Digitonin treatment (Figure 3C, left), hypotonic lysis fractionation (Figure 3C, middle) and immunofluorescence (Figure 3C, right) show that TbPLA1b without PTS1-like signal has the same cytosolic distribution as enolase, i.e. all TbPLA1b localises in the

cytoplasm. Thus, the SKS C-terminal signal is required for glycosomal targeting. In contrast, the TbPLA1b^{SKLNTy} protein is exclusively localised in the glycosomal compartment (Figure 3D). Together, these data showed that SKS PTS1 motif is responsible for the partial glycosomal localisation of PLA1b.

TbPLA1b secreted by BSF and anti-TbPLA1b antibodies are produced by Trypanosoma brucei gambiense infected mice.

To confirm previous observations that TbPLA1b is secreted by *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg) BSF²⁴, we incubated the 427 *T. brucei* strain in a medium promoting the secretion / excretion of proteins and analysed the presence of TbPLA1b in these fractions by Western Blotting³⁴. As shown in Figure 4A (left), TbPLA1b is well detected in the protein material excreted by the parasites while Threonine dehydrogenase (TDH) a soluble marker of mitochondria is not confirming previous proteomic analysis of secreted/excreted proteins in African trypanosomes.

The detection of TbPLA1b in the excreted/secreted material released by the parasites, may favor its recognition by the immune system of the infected host. To test if specific antibodies are raised against TbPLA1b during trypanosome infection, we tested the sera of healthy mice and experimentally infected mice with *T.b gambiense* (Tbg)³⁵. The recombinant protein expressed in *E.coli* was resolved by SDS-PAGE and these sera were used for detection by Western Blotting as previously described by others¹³. As shown in Figure 4B, a signal is only obtained for samples collected during infection, indicating that infected mice develop an immune response against TbPLA1b.

Discussion

Only one enzyme with phospholipase A1 activity had been previously characterized in African trypanosomes^{18,19}. This enzyme is cytosolic, not excreted and involved in the synthesis of lyso-PC metabolites. In this study we describe TbPLA1b, a new phospholipase with A1 activity that showed a dual cytosolic and glycosomal localisation. The glycosomal localisation is due to a unique non-canonical PTS1 signal (SKS). In addition, the enzyme is found in the material excreted by the parasites and antibodies against this protein were detected in mice experimentally infected with *T.b gambiense*.

We found that TbPLA1b is not essential for the survival of parasites cultured under standard *in vitro* conditions, nor during an infection in mice. Indeed, we have seen

using two reverse genetics approaches (i.e RNA interference and gene knock-out), that parasites with no TbPLA1b expression grow at the same rate as the parental strain. In addition, the KO cell-line is as virulent as the parental cell-line in a virulent mouse model of infection. In the future, it would be interesting to test the chronic effect of the absence of TbPLA1b using a pleomorphic strain that cause longer infection³⁶. Nevertheless, from our results we can conclude that TbPLA1b is not a critical virulence factor for the establishment of an *in vivo* infection.

Among African trypanosomes, *T.brucei* has the highest PLA1 activity¹⁵, in particular compared to *T. congolense* for which it is very low. Interestingly, PLA1 activity was detected in the blood plasma of rabbits infected with *T. brucei*¹⁷. Thus, one may consider that this activity helps the parasites to penetrate the endothelium and other barriers, since *T. brucei* invades tissues while *T. congolense* remains vascular³⁷. Another important function could be the detoxification of the environment, especially lysophospholipases (LPLs). We and others (our unpublished work,³⁸) have observed that BSF do not metabolize phosphatidylcholine, but lysophospholipids decrease very strongly. TbPLA1b could, as observed for most phospholipases A1⁴, also have a LPL activity. Moreover it is interesting to notice that in some cases the gene is annotated as LPL. Given the versatility and diversity of sequences, it is complicated to classify these enzymes on its amino sequence, most can cleave several substrates: PL, LPL, di/tri glycerides. *In vitro* studies may not reflect the reality *in vivo*, and that is the reason why we have not focused our work on the specificity of substrates very precisely. This may be done later with the recombinant protein, in particular because there could be applications for the industry. To date, few PLA1 proteins have been expressed and purified. This type of protein could have a particular utility in the production of lipids that are used in cosmetics and in the food industry^{10,39}.

TbPLA1b is the second phospholipase A1 experimentally described in African trypanosomes. Its distribution is very peculiar since conventionally phospholipases are highly compartmentalized enzymes, in particular they are very often found associated with membranes where they play an important role for the remodeling of membrane lipids^{3,10}. The first phospholipase A1 described in *T. brucei* PLA1a¹⁹ is located only in the cytosol and is not excreted, so it is unlikely that these two enzymes are functionally redundant since they do not show the same compartmentalisation. Like other protozoan parasites, African trypanosomes have several phospholipases genes in

their genome in addition to PLA1a and PLA1b (our unpublished work,^{11,40}). An explanation for this expansion could be a possible functional redundancy. It will be necessary to study these proteins in greater detail in order to have a more complete and exhaustive understanding of the PLs function in trypanosomes.

The phospholipase that we have studied here, although conserved in kinetoplastids, illustrates a complexity surrounding the understanding of these proteins since, for example, this protein might not be distributed in the same way in the different kinetoplastids because not all of them have the PTS1 (Figure 1). Moreover in the genome of *T.brucei* there are only three proteins with the non-canonical PTS1 signal "SKS" and among them, only TbPLA1b is addressed partially in glycosomes. In the absence of knowledge about the intracellular function of this protein, an explanation for this observation is difficult to advance. Nevertheless, we can speculate that this non-canonical signal is not effectively supported by the cytosolic chaperones responsible for transporting proteins to glycosomes. This has already been shown for other proteins in other cell types. As an example, the catalase of the yeast *H. polymorpha* has a non-canonical "SKI" signal⁴¹. A study showed that, by replacing this SKI sequence with a SKL sequence, the protein goes entirely into glycosomes⁴¹. However a part would form aggregates in glycosomes in which the protein would not be active. The import into the glycosomes would be so effective that it would not allow the protein to take its correct conformation. Thus the presence of a weak, less well-supported signal would leave time for the protein to take its correct folding. This could also be the case for TbPLA1b. In this scenario, the main function of the protein could reside in the glycosomes and the cytosolic fraction would be largely unfolded and therefore not active. We could also consider that the cytosolic part is active. An excess in the cytosol can be deleterious for the cell because PL are toxins. A way to detoxify would be to excrete the enzyme outside of the cell, which is what we observe (figure 4).

Finally, at some points TbPLA1b is facing the serum of the animals either because it is released upon parasite destruction or because it is excreted/secreted as we suggested in this study. The enzyme is immunogenic enough that specific antibodies are raised upon infection. TbPLA1b could be a very interesting target for the diagnosis of this parasitosis that is still not accurate specially for animals⁴².

The phospholipases of African trypanosomes are very little known, few genes are described and our study contributes modestly to fill this gap and pave the way for more studies.

Materials and Methods

Trypanosome growth and transfection

The bloodstream form of *T. brucei* Lister 427 90-13 (TetR-HYG T7RNAPOL-NEO), a Lister 427 221a line (MiTat 1.2) designed for the conditional expression of genes was cultured at 37°C in HMI-9 (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*, Life Technologies) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 0.25 mM β -mercaptoethanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0.16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM bathocuprone and 2 mM L-cysteine). Transfections were performed using Amaxa nucleofection method as previously described⁴³.

Fluorometric phospholipase A assays

PLA1 activity was monitored using EnzCheck® Phospholipase Assay Kits (Invitrogen, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions and as previously described by Gaspar & al⁴⁴. Reactions were performed in black 96-well microplate for one hour at room temperature. The substrate PED-A1 is a Bodipy FL dye labelled glycerophosphatidylethanolamine, the emission of which is dequenched upon PLA1 hydrolysis. Activities (30 µg per protein) were monitored by measuring fluorescence intensities at 485 nm excitation and 530 nm emission with an Optima microplate reader (BMG Labtech, Germany).

Production of recombinant TbPLA1b and specific antibodies

A recombinant *T. brucei* full length PLA1b fused to a GST tag on its N-terminal extremity, was expressed in *E. coli* One Shot® BL21star™ (DE3) (ThermoFisher) using the pGEX4T1 expression vector (GE Healthcare). Protein expression was induced at 37°C for 3 h using 0.5 mM isopropyl-D-thiogalactopyranoside. The cells were harvested by centrifugation, resuspended in PBS and sonicated. Proteins released in the soluble form were purified using Glutathione Sepharose 4B™ according to the manufacturer's instructions (GE Healthcare). On-column thrombin digestion was

performed to release the protein without the GST tag, then dialysed against PBS. Purified recombinant TbPLA1b was used as an antigen to raise polyclonal antibodies. Two rabbits were injected 4 times at 15-days intervals using Covalab facilities (www.covalab.com).

Site-directed mutagenesis

To mutate the serine 171 to alanine two complimentary primers were synthesized (TableS2). The vector pGEX4T1/PLA1b was used as a template and the amplification was performed using the *Pfu* ultra (Agilent, 600380). The PCR product was digested with *dpn1*, and then transformed in *E coli* XL1-blue. Plasmids were then extracted and sequenced (Eurofins genomics facilities) to confirm the presence of the mutation.

Western blotting analyses

For Western blot analysis, total protein lysates of *T.brucei* BSF were separated by SDS-PAGE (4-20% Mini PROTEAN TGX stain-free precast gradient gels, Bio-Rad) and blotted on PVDF filters (Bio-Rad). The membranes were blocked with PBS 5% milk powder for 1 h at RT. Primary and secondary antibodies were diluted in PBS with 0.05% Tween 20 and 5% milk powder: rabbit anti-PLA1b 1:1000 mouse anti-TY 1: 500 anti-aldolase 1:10000 anti-enolase 1:100000 Rabbit anti-PFR 1:10000 anti-mouse conjugated to horseradish peroxidase (KPL) 1:5000; or anti-rabbit conjugated to horseradish peroxidase (KPL) 1:10000. Revelations were done using Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions, pictures were acquired using a LAS4000 imager (GE Healthcare).

Immunofluorescence Assay

Parasites grown in culture were collected by centrifugation, washed and fixed in paraformaldehyde as described elsewhere³⁷. Slides were incubated with primary antibodies followed by Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse secondary antibody or Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody (diluted 1:400) (Invitrogen). The nuclei were stained with DAPI (10 μ g/mL) and cells were observed using a Zeiss Axio imager Z1 microscope; images were captured using Metamorph® software (Molecular Devices). Images were processed using ImageJ software.

RNA interference and gene knock-out

The inhibition by RNAi of the expression of the *TbPLA1b* gene in the 427 BSF was performed by expression of stem-loop « sens/antisens » RNA molecules of the targeted sequences introduced into the pLew100 as previously described³¹. The sequence corresponding to the first 400 bp of the coding sequence was targeted. The sense and antisens fragments separated by 50 bp were cloned into the *HindIII* and *XhoI* restriction sites of the pLew100 vector.

Replacement of the *TbPLA1b* gene by the blasticidin and puromycin resistance markers *via* homologous recombination was performed using DNA fragments containing a resistance marker gene flanked by the *TbPLA1b* UTR sequences. The pGEMt plasmid was used to clone an *HpaI* DNA fragment containing the blasticidin and the puromycin resistance marker gene preceded by the *TbPLA1b* 5'UTR fragment and followed by the 3' UTR fragment. Correct homologous integration of the resistance markers in the resulting drug resistant clones was analysed by PCR (see Fig. S3).

Digitonin Permeabilisation

Trypanosomes were washed 2 times in cold PBS and resuspended at 6.5×10^8 cells per mL (corresponding to 3.3 mg of protein/mL) in STE buffer (250 mM sucrose, 25 mM Tris, pH 7.4, and 1 mM EDTA) supplemented with 150 mM NaCl and the Complete™ Mini EDTA-free protease inhibitor mixture (Roche Applied Bioscience) and 1mM DTT. Cell aliquots (200 μ L) were incubated with increasing quantities of digitonin for 4 min at 25°C, before centrifugation at 14,000 g for 2 min. Samples were then analysed by Western blot.

Cell Fractionation

10^8 parasites were washed in PBS and incubated in hypotonic lysis buffer (5 mM Na_2HPO_4 , 0,3 mM KH_2PO_4) for 30 minutes at 4°C before centrifugation at 14.000g for 15 minutes. Material in the pellet was solubilised in SDS. Both pellet and supernatant were prepared for SDS-PAGE by adding Laemmli buffer⁴⁵.

Secretome of bloodstream form Trypanosomes

10^8 parasites were washed in trypanosome dilution buffer (TDB, 20mM Na_2HPO_4 , 80mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgSO_4 , 20mM glucose, pH7.4) and incubated in 15ml of

50% serum-free HMI9, 50% TDB. During the experiment, cell viability was checked by microscopy. After 3 hours, cells were removed by centrifugation and Trypanosome-free medium was carefully taken, passed through a 0.22 μ m syringe filter and concentrated 70 times using a Protein Concentrator 10,000 molecular weight cut-off filter unit (Pierce). Samples were then analysed by western blotting.

Mice infection

In vivo experiments were performed with 10-weeks old male C57BL/6J mice, from Charles River Laboratories International. Mice were housed in a Specific-Pathogen-Free barrier facility, at Instituto de Medicina Molecular. The facility has standard laboratory conditions: 21 to 22°C ambient temperature and 12h light/12h dark cycle. Chow and water were available *ad libitum*. Animal experimentation work was performed according to EU regulations and approved by the Animal Care and Ethical Committee of Instituto de Medicina Molecular (AWB_2016_07_LF_Tropism).

The inoculum was prepared from thawed *T. brucei* cryostabilates and parasite motility was checked under an optic microscope. Mice were infected by intraperitoneal (i.p.) injection of 2000 parasites. At day 5 post-infection, animals were euthanized by CO₂ narcosis and immediately perfused transcardially with pre-warmed heparinised saline (50mL phosphate buffered saline (PBS) with 250 μ L of 5000 I.U./mL heparin). Organs were collected and snap frozen in liquid nitrogen.

Parasite quantification in blood and organs

For parasitemia quantification, blood samples were taken daily from the tail vein and parasites counted manually in a hemocytometer (detection limit is 3.75x10⁵ parasites per mL of blood). Quantification of parasites in organs was performed by quantitative PCR of genomic DNA, as previously described in³⁶.

Figure Legends

Figure 1: Comparison of PLA1b in kinetoplastids

A / Alignment of PLA1b from kinetoplastids. Sequences were aligned using Clustal omega basic settings and edited using the Jalview software. Dark blue contains conserved residues, white to light blue contains conservative changes. Box I emphasizes the conservation of the putative phospholipase active site. Box II emphasizes the differences between kinetoplastids PLA1b Carboxy-terminus. Tb, *Trypanosoma brucei brucei* (Tb927.8.6390); Tbg, *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg972.8.6450), Tev, *Trypanosoma evansi* (TevSTIB805.5.6680); Tco, *Trypanosoma congolense* (TcIL3000_8_6240); Tv, *Trypanosoma vivax* (TvY486_0805980); Tcr, *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.506797.70); Lmx, *Leishmania Mexicana* (LmxM.24.1840). B / Only 3 proteins are ending with SKS in *Trypanosoma brucei brucei*. The search was performed on TriTrypDB.org using the « Protein Motif Pattern » tool.

Figure 2: Activity of recombinant TbPLA1b and analysis of bloodstream form mutants.

A / PLA1 activity assay on recombinant proteins expressed in *E.coli*. Purification steps were analysed by coomassie gel (above gel). As exemplified for TbPLA1b, SF (Soluble Fraction), FT (Flow Through), W1-2 (Washes), CE1-2 (Cleavage/Elution after thrombin release). Tested fractions were dialysed against PBS. PLA1 activity was measured using Enzcheck™ PLA1 assay (Molecular Probes®). Control was a commercial phospholipase A1 (Sigma L3295). TbPLA1b, full-length TbPLA1b; TbPLA1b^{SA171}, mutated TbPLA1b where the putative active serine 171 was replaced by an alanine; GST, Glutathion-S-Transferase was eluted with 20mM glutathione instead of thrombin cleavage. Supplemental informations concerning expression and purification can be found on figure S1.

B / Left: TbPLA1b is expressed in both Bloodstream and Procyclic forms. Total protein extracts from both forms of Tb were resolved by SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose as described in materiel and method section. Membranes were probed with sera raised against TbPLA1b and PFR. Right panel is a control with the pre-immune sera from the animal before immunisation with TbPLA1b. Middle: Inhibition of TbPLA1b expression by interference RNA. Growth of the parental cell-line and 3

independent clones cultivated with (i) or without (ni) tetracycline. Right panel shows the Δ TbPLA1b validation by Western Blotting as TbPLA1b is not detected anymore. A specific affinity-purified anti-TbPLA1b antibody was used and PFR was used as loading control.

C-D / Mice infection with wild-type (dark grey) and Δ TbPLA1b (light grey) Tb427 BSF. Error bars represent the standard error of the mean (n=4 per group).

C / Parasitemia of infected mice quantified by hemocytometer.

D / Number of parasites in heart, kidney and gonadal adipose tissue, 5 days after infection, quantified by qPCR.

Figure 3: Subcellular distribution of TbPLA1b in Bloodstream forms

Digitonin titration (left of B, C and D): Western blot analysis of the supernatant (s) and pellet (p) fractions from cells incubated with 0,01-0,4 mg digitonin/ mg protein in STE buffer containing 150 mM NaCl. The digitonin concentration required to release cytosolic (cyt) and glycosomal (gly) marker proteins are indicated by vertical dash line. TbPLA1b was detected with specific anti-TbPLA1b in A and anti-TY in B, C and D. For technical reasons two gels/membranes were needed to analyse the whole set of sample. The Vertical line between 100 and 160 indicates a delimitation between two different membranes.

Hypotonic lysis (middle of B, C and D): Western blot analysis of supernatant (s) and pellet (p) fractions from cells incubated with hypotonic buffer. Anti-TY was used for detection of TbPLA1b.

Immunofluorescence Assay (IFA; right of B, C and D). Cells were stained with monoclonal mouse anti-Ty (Fluorescein channel) and rabbit anti-Aldolase (Alexa 568 channel). Nucleus and kinetoplast are stained with DAPI. Anti-TY was used for detection of TbPLA1b.

Figure 4: TbPLA1b as a potent virulence factor

A / Left: Detection of PLA1b in WT Tb BSF excreted/secreted material (E/S). Threonine Dehydrogenase (TDH) was used as a negative control. Specific anti-TbPLA1b was used for detection. Right: Quality control of Whole Cell Extract (WCE) and Excreted-Secreted Antigens (SDS-PAGE stained by Coomassie).

B / Antibodies directed against TbPLA1b are produced during infection Recombinant full-length TbPLA1b was resolved by SPS-PAGE followed by a Western Blot. Mice

serum taken before and during infection by *T.b gambiense* were used as primary antibody. Signal is detected only during infection (arrow).

Supplemental

Figure S1: Expression and purification of TbPLA1b. Left: Expression in *E.coli* BL21Star, non-induced, NI; induced with IPTG, I. Middle: Purification steps using Glutathion sepharose beads followed by glutathione elutions. SF (Soluble Fraction), FT (Flow Through), W1-2 (Washes), E1-3 (elutions with glutathion). Right: Thrombin cleavage. MW, Molecular weight; W (Wash); CE1-2 (Cleavage-Elution).

Figure S2: A: Multiple sequence alignment of TbLysoPLA and Tb, Tcr and Lbr PLA1. Amino acid sequences were aligned with Clustal Omega using basic settings and edited using the Jalview software. Dark blue contains conserved residues, white to light blue contains conservative changes. The lipase consensus pattern is underscored by a red lign. TbLysoPLA, *Trypanosoma brucei* LysoPLA (Accession number in GeneDB Tb927.8.6390); TbPLA1, *Trypanosoma brucei* PLA1 (Accession number CAG29794, ¹⁹); TcPLA1, *Trypanosoma cruzi* PLA1 (Accession number JN975637, ¹³); LbrPLA1, *Leishmania braziliensis* PLA1 (Accession number KJ957826, ¹⁴). **B: Percentage of identity among kinetoplastids.** Protein sequences were aligned using Clustal Omega Algorhythm with basic settings then identity matrix was retrieved. **C: Expression of TbPLA1b and TbPLA1.** Total protein extracts were resolved by SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose as described in materiel and method section. Membranes were probed with anti-TbPLA1b, anti-TbPLA1a and anti-PFR. TbBsf, *T. brucei* Bloodsream form; TbPCF, *T. brucei* Procyclic form; TbPLA1b; TbPLA1b knock-out cell-line Tb bloodstream form; LmxPM, *Leishmania Mexicana* promastigote form. PFR was used as loading control.

Figure S3: Generation of the Δ TbPLA1b cell-line. TbPLA1b alleles were replaced in the Tb427 parental cell-line by blasticidin and puromycin resistance genes. A / Representation of the wild type and recombinant loci and the PCR strategy to identify marker integration and wild-type loci.

B / Analysis of genomic DNA extraction from parental cell-line (WT) or from a clone Δ TbPLA1b by PCR amplification of the fragments presented in A (for primers see supplementary table).

Table S1: Percentage of conservation of PLA1b among kinetoplastids. Protein sequences were aligned using Clustal Omega Algorithm with basic settings then identity matrix was retrieved.

Table S2: Primers used for PCR

References

1. Barrett, M. P., Boykin, D. W., Brun, R. & Tidwell, R. R. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 1155–1171 (2007).
2. Van den Bossche, P. Some general aspects of the distribution and epidemiology of bovine trypanosomosis in southern Africa. *Int. J. Parasitol.* **31**, 592–598 (2001).
3. Dennis, E. A. 9 Phospholipases. in *The Enzymes* vol. 16 307–353 (Elsevier, 1983).
4. Aoki, J., Inoue, A., Makide, K., Saiki, N. & Arai, H. Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. *Biochimie* **89**, 197–204 (2007).
5. Burke, J. E. & Dennis, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* **50 Suppl**, S237-242 (2009).
6. Ye, X. *et al.* Activities of Venom Proteins and Peptides with Possible Therapeutic Applications from Bees and WASPS. *Protein Pept. Lett.* **23**, 748–755 (2016).
7. Kini, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. *Biochem. J.* **397**, 377–387 (2006).
8. Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A. & Flieger, A. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **80**, 597–628 (2016).
9. Köhler, G. A. *et al.* Phospholipase A2 and phospholipase B activities in fungi. *Biochim. Biophys. Acta* **1761**, 1391–1399 (2006).
10. Richmond, G. S. & Smith, T. K. Phospholipases A1. *Int. J. Mol. Sci.* **12**, 588–612 (2011).
11. Belaunzarán, M. L., Lammel, E. M. & de Isola, E. L. D. Phospholipases a in trypanosomatids. *Enzyme Res.* **2011**, 392082 (2011).
12. Tani, K., Kogure, T. & Inoue, H. The intracellular phospholipase A1 protein family. *Biomol. Concepts* **3**, (2012).
13. Belaunzarán, M. L. *et al.* Phospholipase A1: a novel virulence factor in *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **187**, 77–86 (2013).
14. Bott, E. *et al.* Cellular localization, cloning and expression of *Leishmania braziliensis* Phospholipase A1. *Microb. Pathog.* **141**, 104010 (2020).
15. Hambrey, P. N., Mellors, A. & Tizard, I. R. The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2**, 177–186 (1981).
16. Opperdoes, F. R. & van Roy, J. The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. *Mol. Biochem. Parasitol.* **5**, 309–319 (1982).
17. Hambrey, P. N., Tizard, I. R. & Mellors, A. Accumulation of phospholipase A1 in tissue fluid of rabbits infected with *Trypanosoma brucei*. *Tropenmed. Parasitol.* **31**, 439–443 (1980).
18. Richmond, G. S. & Smith, T. K. The role and characterization of phospholipase A1 in mediating lysophosphatidylcholine synthesis in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. J.* **405**, 319–329 (2007).
19. Richmond, G. S. & Smith, T. K. A novel phospholipase from *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* **63**, 1078–1095 (2007).
20. Ollis, D. L. *et al.* The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197–211 (1992).

21. Colasante, C., Ellis, M., Ruppert, T. & Voncken, F. Comparative proteomics of glycosomes from bloodstream form and procyclic culture form *Trypanosoma brucei*. *PROTEOMICS* **6**, 3275–3293 (2006).
22. Güther, M. L. S., Urbaniak, M. D., Tavendale, A., Prescott, A. & Ferguson, M. A. J. High-confidence glycosome proteome for procyclic form *trypanosoma brucei* by epitope-tag organelle enrichment and SILAC proteomics. *J. Proteome Res.* **13**, 2796–2806 (2014).
23. Opperdoes, F. R., Borst, P. & Spits, H. Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **76**, 21–28 (1977).
24. Geiger, A. *et al.* Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*. *BMC Microbiol.* **10**, 20 (2010).
25. Alsford, S. *et al.* High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. *Genome Res.* **21**, 915–924 (2011).
26. Dennis, E. A., Cao, J., Hsu, Y.-H., Magrioti, V. & Kokotos, G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chem. Rev.* **111**, 6130–6185 (2011).
27. Walter, T. & Erdmann, R. Current Advances in Protein Import into Peroxisomes. *Protein J.* **38**, 351–362 (2019).
28. Bue, C. A., Bentivoglio, C. M. & Barlowe, C. Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4780–4789 (2006).
29. Zhou, Q., Gu, J., Lun, Z.-R., Ayala, F. J. & Li, Z. Two distinct cytokinesis pathways drive trypanosome cell division initiation from opposite cell ends. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 3287–3292 (2016).
30. Millerioux, Y. *et al.* The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: the main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. *Mol. Microbiol.* **90**, 114–129 (2013).
31. Rivièrè, L. *et al.* Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 12694–12699 (2009).
32. Kael, V. C., Schliebs, W. & Erdmann, R. Identification and functional characterization of *Trypanosoma brucei* peroxin 16. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1853**, 2326–2337 (2015).
33. Bastin, P., Bagherzadeh, Z., Matthews, K. R. & Gull, K. A novel epitope tag system to study protein targeting and organelle biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**, 235–239 (1996).
34. Proto, W. R. *et al.* *Trypanosoma brucei* metacaspase 4 is a pseudopeptidase and a virulence factor. *J. Biol. Chem.* **286**, 39914–39925 (2011).
35. Giroud, C. *et al.* Murine Models for *Trypanosoma brucei* gambiense Disease Progression—From Silent to Chronic Infections and Early Brain Tropism. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, e509 (2009).
36. Trindade, S. *et al.* *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice. *Cell Host Microbe* **19**, 837–848 (2016).
37. Thonnus, M., Guerin, A. & Riviere, L. A multigene family encoding surface glycoproteins in *Trypanosoma congolense*. *Microb. Cell* **4**, 90–97 (2017).
38. Creek, D. J. *et al.* Metabolomics guides rational development of a simplified cell culture medium for drug screening against *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2768–2779 (2013).
39. De Maria, L., Vind, J., Oxenbøll, K. M., Svendsen, A. & Patkar, S.

Phospholipases and their industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 290–300 (2007).

40. Jackson, A. P. *et al.* A cell-surface phylome for African trypanosomes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2121 (2013).

41. Williams, C., Bener Aksam, E., Gunkel, K., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. The relevance of the non-canonical PTS1 of peroxisomal catalase. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1823**, 1133–1141 (2012).

42. Roger, F. L. *et al.* Advocacy for identifying certain animal diseases as “neglected”. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0005843 (2017).

43. Ammar, Z., Plazolles, N., Baltz, T. & Coustou, V. Identification of trans-sialidases as a common mediator of endothelial cell activation by African trypanosomes. *PLoS Pathog.* **9**, e1003710 (2013).

44. Gaspar, A. H. & Machner, M. P. VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 4560–4565 (2014).

45. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

Author Contributions

L.R and LM.F conceived the study; S.M, A.L, M.T, T.B-R and L.R Conducted the experiments. S.M, A.L, M.T, T.B-R, LM.F and L.R analysed the data. S.M, M.T, T.B-R, LM.F and L.R wrote the manuscript. S.M, M.T, T.B-R, F.B, LM.F and L.R reviewed the manuscript. All authors approved the manuscript prior to submission.

Additional Informations

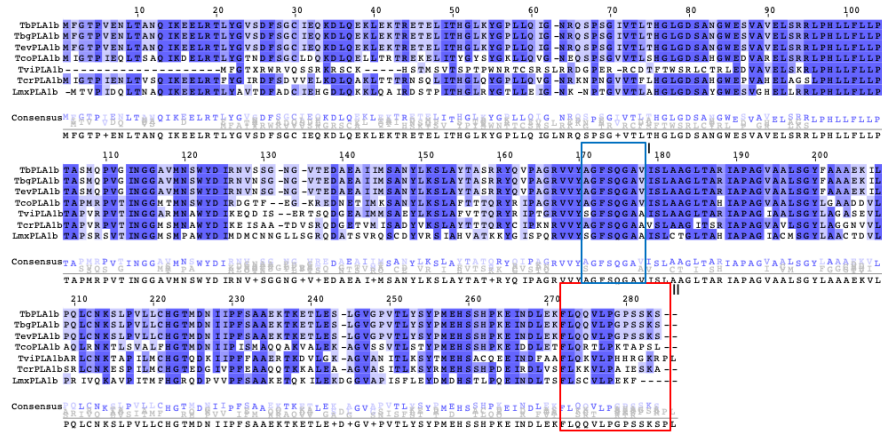
Supplementary informations accompanies this paper.

Competing financial interests

The authors declare no competing interests.

Figure 1

A



Box I

```

TbPLA1b AGFSQGA V
TbgPLA1b AGFSQCA V
TevPLA1b AGFSQCA V
TcoPLA1b AGFSQCA V
TviPLA1b SGFSQGA A
TcrPLA1b AGFSQGA A
LmxPLA1b SGFSQGA A

Consensus AGFSQGA V

```

Box II

```

TbPLA1b FLQQLVLP GSSKSS --
TbgPLA1b FLQQLVLP GSSKSS --
TevPLA1b FLQQLVLP GSSKSS --
TcoPLA1b FLQRTLPKTA PSL --
TviPLA1b FLQKVLPHRGR RPL --
TcrPLA1b FLKKVLP AIESKA --
LmxPLA1b FLSCVLP EKF ----

Consensus FLQQLVLP

```

B

Id	Product	Localisation	References
Tb927.8.6390	Phospholipase	Glycosome/Cytosol	This paper
Tb927.2.4620	Transmembrane adaptor Erv26	COPII vesicles	27
Tb927.11.15800	Cytokinesis Factor I (CIFI)	Cell Tip (anterior)	28

Figure 2

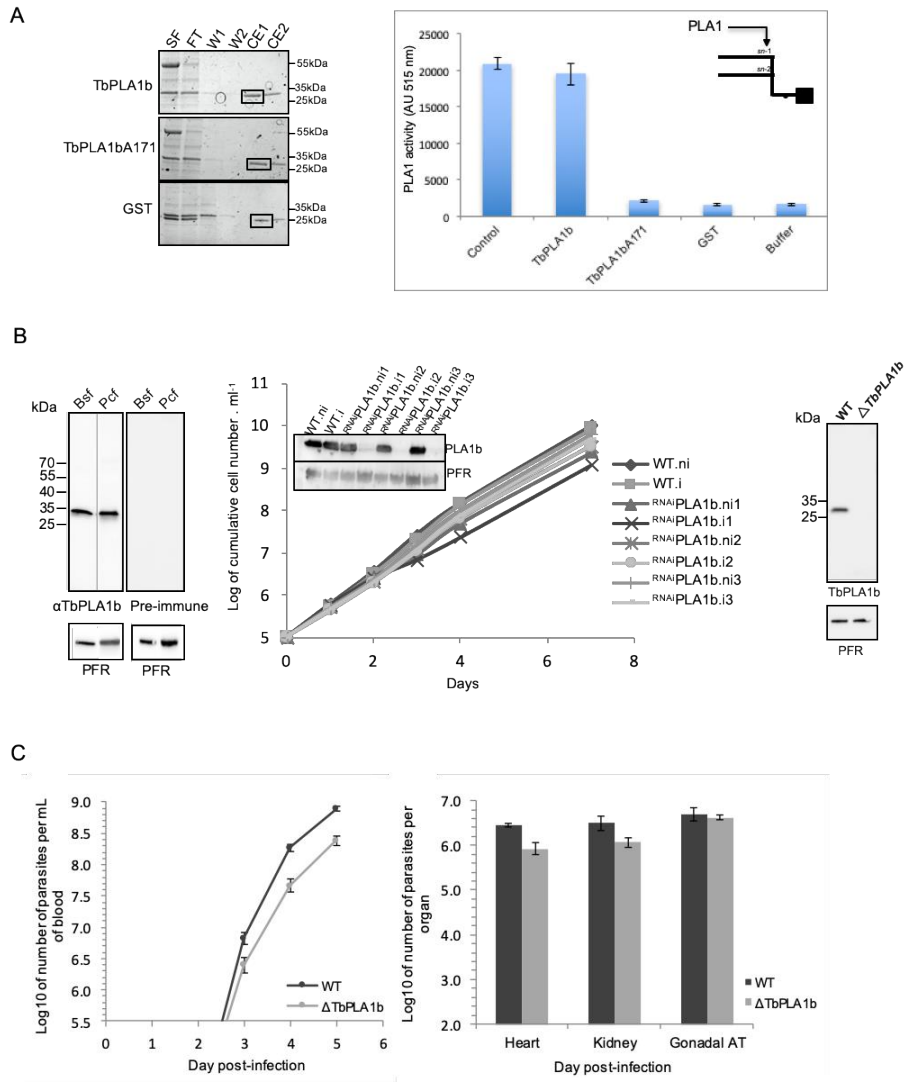


Figure 3

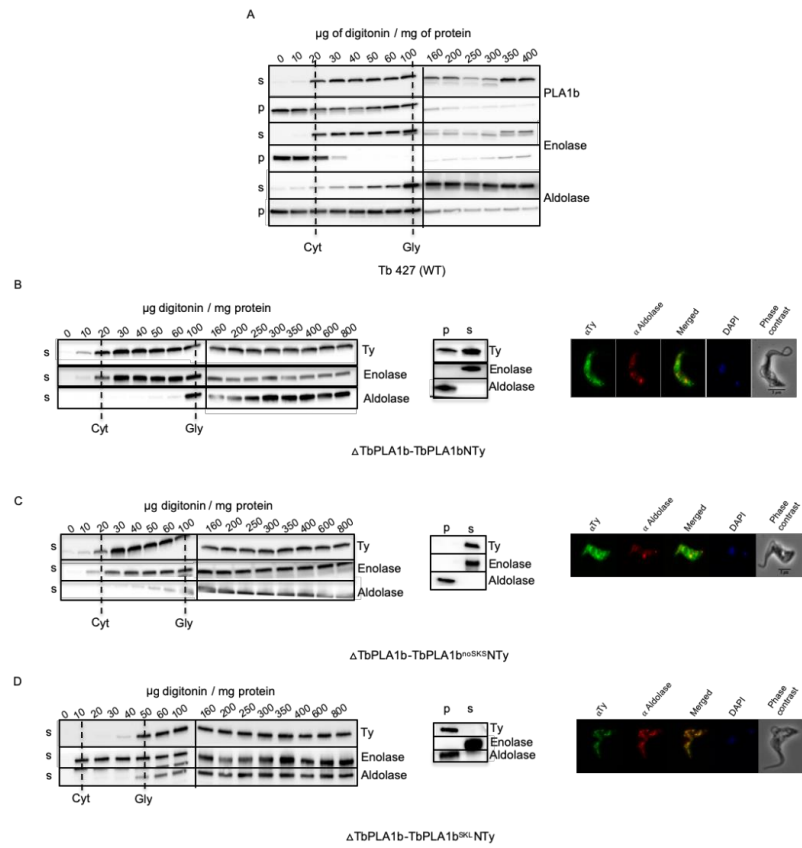


Figure 4

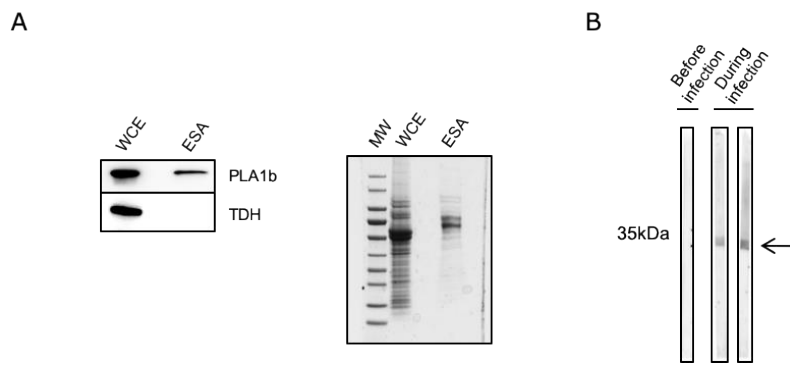


Figure S1

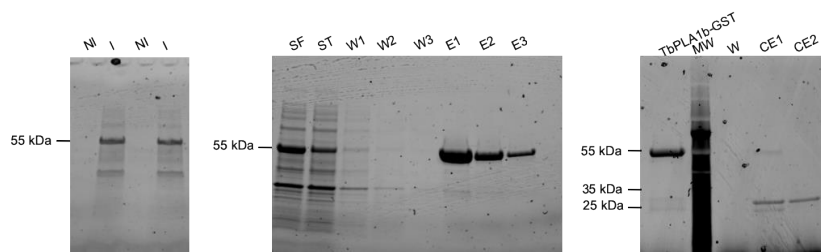


Figure S2

A

```

TbPLA1b -----MFGTIV---EMLTANQREELKTLICWSDPFGCIEQKDLOKLEKRETEIIFHGLKGLLQIQNSQSPSEIV
TbPLA1a -----NS-----ESVDLTKTYLQSCDSEIDSS-----R-----KFAIEN---EELCC
TcPLA1 -----NRRR-----RTH-----TVVVVIL-----ILCGEDVRADSEVRLAT-----T-----ALYYAAAYCKAEATSSW---TCVSC
LbrPLA1MSIAITLERRHPQLHSCASLCTVLLVSLMMLLAFPLFTSLTKKSESIESHTASLDRNMTGR-----K-----ALYPCSAAYCPVKVSEIEM---NCGSA

ConsensusMSIAITHERRPQLHSCASLCTVLLVSLMMLLAFPLFTSLTKKSESIESHTASLDRNMTGR-----K-----ALYPCSAAYCPVKVSEIEM---NCGSA
MSIAITM+RRMPQLHSC+++CVTT++V+++M+++P+PFSLE++++LLI+E+++DYSV+++SGCIEQKDLOKLEKRETEIY++K+AYCP+K+I+EWQS+CGSC

TbPLA1b TLTHTGLGDSANGWESVAVELSRRL--PHL--LF-LLP-----TAEQPVG INCGAVMNSWYD IRMV-----SSGNGVTEDA--EAIIMANL
TbPLA1a HVVVGEGHLPDGLVC TRREVGLKRDSECCFRSLEFFG-----EKVLAFAVUMNRSAPES-----ADQVVKGDH----EK
TcPLA1 ASN-----PCMQ-----KVRVPTAKHSTQAFVGVNN--SMIVSFRGTVLNNMLYDLDIFIPVYVIRDCVY--GCLVHAGFHCLESLWAE
LbrPLA1CSN-----ATPNFR-----VFNVVDNITSTGNFGYSIDNDAGRIVVVFRTHTHTENN IQDLDFMSIPVPHPCGNNCR IHRGFLYRAYSVRWQ

ConsensusTLTHTGLGDSANGWESVAVELSRRL--PHL--LF-LLP-----TAEQPVG INCGAVMNSWYD IRMV-----SSGNGVTEDA--EAIIMANL
+SN+G+G+++GW++++E+PG+KRD+++GF+YTN+++++G+N+ASMIVV+FRGTHD+N+W++DLDI+++PY+++SCNGCL+HAGF+A++S++Y+

TbPLA1b KSLAVTASRRVQVPAQRVVVAEFSQAVISLAAGLTAR IAPAGVAALSGYFAAAEKILQLCNKSLPVLCHGTMDN IIPFSAAEKTEIETESLGVGPTVSYFPM
TbPLA1a LAANAALVVSAPGLSNWSPFCRSLGGCLTAAAVFTGAP--AI-----TFNANLSSST-----RSEELKFFGVVIVVIFAE
TcPLA1 W+RGLQELVAGKIQILITGSLGGANNTAANLWQ--R-----EFGGAFKLVYVFG
LbrPLA1L IYDVLNMLRHPSTYLPITGSLGGANLAAIDFATW--NV-----SK-REVVDNHW-----QPSAAKPSHLAPMMLYTFGE

ConsensusKSLAVTASRRVQVPAQRVVVAEFSQAVISLAAGLTAR IAPAGVAALSGYFAAAEKILQLCNKSLPVLCHGTMDN IIPFSAAEKTEIETESLGVGPTVSYFPM
L+AY+AS+V+++++V+ITGSLGGANLAAA+++++PANVAALSGYFAAAE+++P++++S+PVLCHGTMDN IIPFSA++++SE+KFGV+PV+LYTFGE

TbPLA1b -----EUSHPK--EINDL-----
TbPLA1a ALDVQRHOLLNSVPAGAPFAGLNSXIQQFGTFXYIYKVIHDRPHYIDAHL--IETIEELRKEGKIS-----AS--DLAASLH
TcPLA1 -----PRVG-----NEAFANLLAS--FCRQGHSEYVTRKRDVPHLLMLFGFYHADREWYDNDGDVTKNCTDIFGTPGSALTADDFNCEDIVSSEIE
LbrPLA1L -----PRVG-----KQYETKSTSV--LA--NEQFRITKADVEVHLLPLGWSVYVFCQEVWYFADDHAYL-----LQDQNSSTEDFLCENVYAVRVA

ConsensusALDVQRHOLLNSVPAGAPFAGLNSXIQQFGTFXYIYKVIHDRPHYIDAHL--IETIEELRKEGKIS-----AS--DLAASLH
ALDVQRHPRVGNVSPAN++FANNL++SK+++G+++YR+TH+++FVPHLIP+L+++H+P+EVWY++DGE+V+KNCITDIFGT+C++++EDP+CS+S++ATS++

TbPLA1b -----FLOQVLPSS-----
TbPLA1a ED--VM-----GCAQLVQKXSVIME--V--VASVNSQPSAGCFGS--S-----
TcPLA1 DRLKYLQVCTRCSCDPGEAMSEELRLPPELERVANDYIYOQSNMRRFPFPPARHRS
LbrPLA1DRLIYFGICTRCCTAAEHEIYKYLKPPETYSLLALDVTMNRSPVTR-----

ConsensusED--VM-----GCAQLVQKXSVIME--V--VASVNSQPSAGCFGS--S-----
DRLY+G+CTRC+C++GSM++++QQLPPE+E+V+A+DYVM++SR+++RF++FPA++++ES
    
```

B

	TbPLA1b	TbPLA1a	TcrPLA1	LbrPLA
TbPLA1b	100			
TbPLA1a	16.06	100		
TcrPLA1	16.29	20.83	100	
LbrPLA	18.27	17.25	37.50	100

C

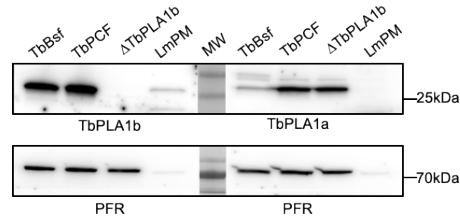
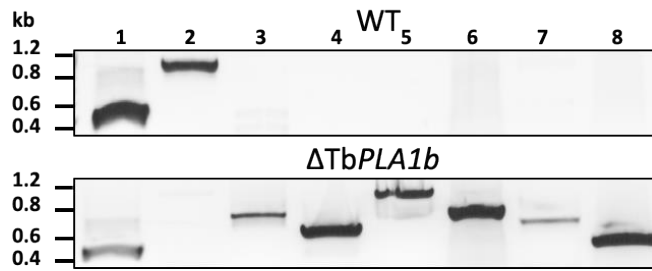


Figure S3

A



B

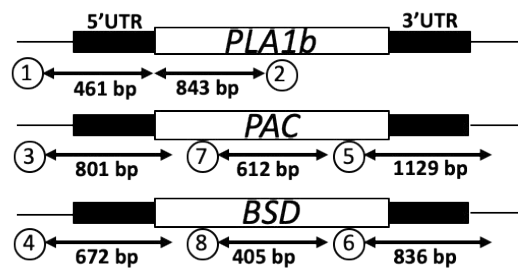


Table S1

	TbPLA1b	TbgPLA1b	TevPLA1b	TcoPLA1b	TviPLA1b	TcrPLA1b	LmPLA1b
TbPLA1b	100						
TbgPLA1b	99.64	100					
TevPLA1b	99.64	99.64	100				
TcoPLA1b	70.61	70.61	70.61	100			
TviPLA1b	52.17	52.17	52.17	51.19	100		
TcrPLA1b	62.86	62.50	62.50	63.44	54.33	100	
LmPLA1b	53.82	53.82	53.82	53.28	43.60	57.61	100

Table S2

Name	Sequence	Purpose
PLA1bpGEXfw	AG CTCGAG ATGTTTGGCACGCCGTTGAGAAT	Heterologous expression in E.coli
PLA1bpGEXfw	AG GGGCCG CTTACGATTTGATGAAGTCCGGG	
PLA1bMDfw	TGCCGGATTCGCGCAAGGTGC	
PLA1bMDrev	GCACCTTGCGCGAATCCGGCA	
PLA1bRNAisens5p	GCA AAGTT ATGTTTGGCACGCCGTTGA	Interference RNA
PLA1bRNAisens3p	GC CTCGAG TACTCCATTCCTGAGCTCA	
PLA1bRNAiantisens5p	GCA AAGTT GA CTCGAG AGACTTTTGGTAATTGGC	
PLA1bRNAiantisens3p	G CTTAGAA TGTTTGGCACGCCGTTGA	
PLA1b5UTRfw	GTTGT CCATGGG TGCC ATTAACT CAACTAT	Knock-out
PLA1b5UTRrev	CAACCG GAATTC CAAAC ATTAG CAACTTTTCAGTGAGTTTCGTAAATG	
PLA1b3UTRfw	CCTTCA TAGAT CGTAA CTCGAG TGGAGTTGTAAGAAAGAGAGGTGAATG	
PLA1b3UTRrev	AACGGC GCCTT ATAATG CAAAC GTGTTTTGGTGCTTGCTCCTACGGC	
PLA1bTyNterfw	GCA AAGTT ATG GAGTCC ATA CAACAA GAT CCACTTGACGCC TTTGGCACGCCGTTGAGAAT	Expression in Trypanosomes
PLA1bTyNterrev	GC CTCGAG TTACGATTCGATGAAGGTCCGGG	
PLA1bnoSKSrev	GC CTCGAG TTATGAAGTCCGGGGAGGACTTGCT	
PLA1bSKLrev	GC CTCGAG TTACAATTCGATGAAGGTC	

In **bold**: restriction sites for cloning
Underlined: sequence TY tag
Italic: change to create a mutation

1.2 Analyses *in silico* complémentaires de TbPLA1b

Ces analyses complémentaires ne sont pas présentes dans l'article ci-dessus et permettent de mettre en avant d'autres résultats sur TbPLA1b et d'approfondir notre connaissance de cette protéine.

TbPLA1b retrouvée dans le trypanosome africain, est une protéine de 280 acides aminés dont le gène présente *in silico* des motifs spécifiques permettant de la classer dans la famille des lipases.

En effet, le gène de la TbPLA1b est composé de 843 paires de bases (pb) et possède un site GGA-TTC-TCG-CAA-GGT, dont l'analogie peptidique G-X-S-X-G prend la forme ici de G-F-S-Q-G entre les acides aminés 169 et 173 de la protéine. Nous remarquons que ce pentapeptide catalytique se situe environ au milieu de la protéine et est accompagné d'une histidine (AA255) et d'un acide aspartique (AA223) complétant la triade catalytique de l'enzyme.

Afin d'appréhender la fonction de ce premier candidat, nous avons fait des analyses *in silico*, à l'aide de bases de données disponibles sur internet. Grâce à la base de données TritypDB, nous avons pu mettre en évidence des domaines particuliers de la TbPLA1b, annotée sur le site Tb927.8.6390, qui montrent son appartenance à la famille des α/β hydrolases.

Afin d'avoir une idée large de la fonction putative de la TbPLA1b, nous avons recherché sa présence dans d'autres organismes. C'est ainsi que nous avons découvert que ce premier candidat possède un orthologue présent dans les cellules de cortex rénal de lapin, étudié il y a plus de 20 ans. Cette analogie a aussi été retrouvée dans le génome humain (Devedjiev et al. 2000) (Aijun Wang et al. 1999) et dans le génome de rat (Aijun Wang, Deems, et Dennis 1997), conférant à cette protéine une structure qui semble conservée dans le temps.

Dans le trypanosome africain, cette protéine a une masse moléculaire d'approximativement 28 kD. L'étude de cette protéine dans d'autres organismes tels que le lapin a permis de lui attribuer une fonction PLA2 calcium indépendante en plus d'une activité lysophospholipase (Portilla et al. 1998). Nous remarquerons ici, que la protéine à activité PLA1 et lysoPL recherchée par les équipes qui travaillaient sur les phospholipases dans le passé, pesait 28 kD (Mellors et Samad 1989).

L'annotation principale dans les différents génomes où cette protéine possède une annotation de fonction, reste principalement son activité lysophospholipase. Les annotations à travers le temps ne sont pas très précises et relativement contradictoires, il nous appartient donc de préciser l'activité de TbPLA1b dans le parasite.

Afin d'observer la proximité phylogénique de ces différentes lipases avec le trypanosome africain j'ai réalisé des alignements de séquence avec le logiciel Geneious entre la TbPLA1b du trypanosome (D6XM23), la PLA1b humaine (O75608), la PLA1b du rat (P70470) et la PLA1b du *Pseudomonas* (Q51758).

On observe sur cet alignement (Figure 46) que les séquences-clés du pentapeptide et de la triade catalytique sont conservées d'un point de vue évolutif, conférant à cette lipase une vraie phylogénie et possiblement une fonction commune.

Un site spécifique existe dans la version particulière du trypanosome africain avec en toute fin de protéine un site terminal -SKS. Cette séquence est proche de la séquence SKL, séquence canonique permettant l'adressage aux peroxyosomes et par extension aux glycosomes (aussi nommée PTS1 (peroxyosome targeting sequence)).

Sur le site TritypDB, cette protéine est prédite pour être glycosomale. Cependant avec le site TrypTag (Dean, Sunter, et Wheeler 2017), qui montre les immunofluorescences de toutes les protéines du génome du parasite étiquetées, cette localisation n'est plus la même.

On observe en effet une localisation cytoplasmique quand la protéine est tagguée en N-terminal et au niveau du flagelle, du cytoplasme et de la lumière du noyau cellulaire quand elle est tagguée au niveau C-terminal.

Une analyse globale prédictive localise TbPLA1b dans les glycosomes (Durrani et al. 2020). La localisation de TbPLA1b est très discutée. Selon (A. Wang et al. 2000) cette lysophospholipase est associée au réticulum endoplasmique et à l'enveloppe nucléaire. Selon (Hirano et al. 2009) elle est aussi en complément dans le cytosol et sur la membrane plasmique. Le rôle de la protéine serait selon eux de dépalmitoyler les protéines et d'éliminer les lysophospholipides du cytosol. Cette localisation a été étudiée dans l'article joint à cette thèse et nous avons conclu que TbPLA1b se trouve à la fois dans le glycosome et le cytosol.

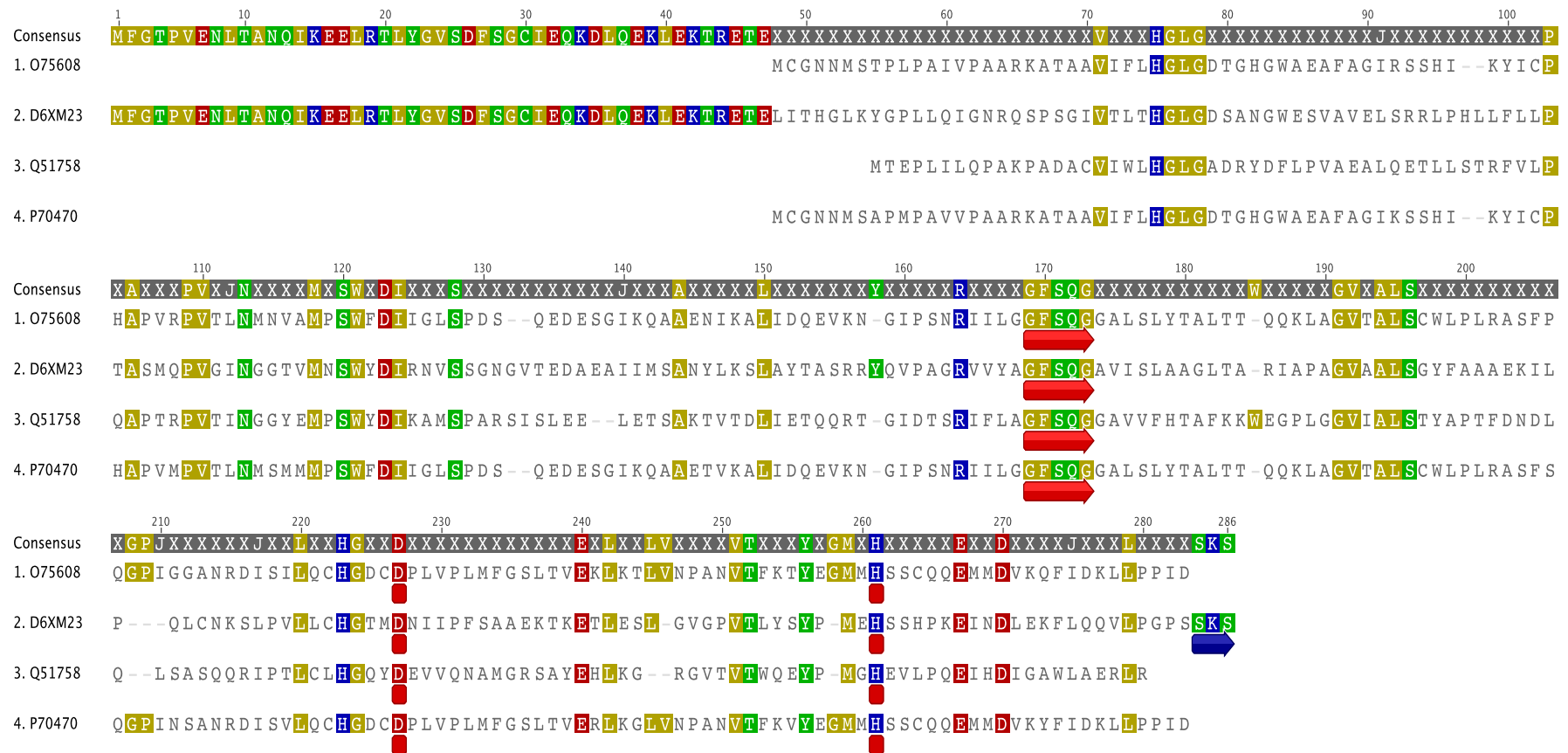


Figure 46 : Alignement des orthologues de la TbPLA1b au niveau du pentapeptide catalytique

Alignement de PLA1b humaine (O75608), PLA1b de rat (P70470), de la PLA1b de Pseudomonas (Q51758) de TbPLA1b de trypanosoma (D6XM23). Les identifiants utilisés sont les identifiants Uniprot. On voit une conservation de la triade catalytique à travers l'évolution.

Par chance, la structure d'une protéine analogue a été cristallisée dans le *Pseudomonas fluorescens* : elle possède le motif α/β hydrolase consensus des lipases (Kim et al. 1997). Plus tard, l'étude de cette protéine dans le génome humain, a permis aux chercheurs de cristalliser une structure comparable à celle présente dans le *Pseudomonas fluorescens* (Figure 47). Encore une fois, l'activité principale décrite, reste l'activité lysophospholipase (Devedjiev et al. 2000). Une autre caractéristique intéressante de cette protéine est son absence de besoin d'activation interfaciale, qui rend l'activité de certaines lipases très contraignantes.

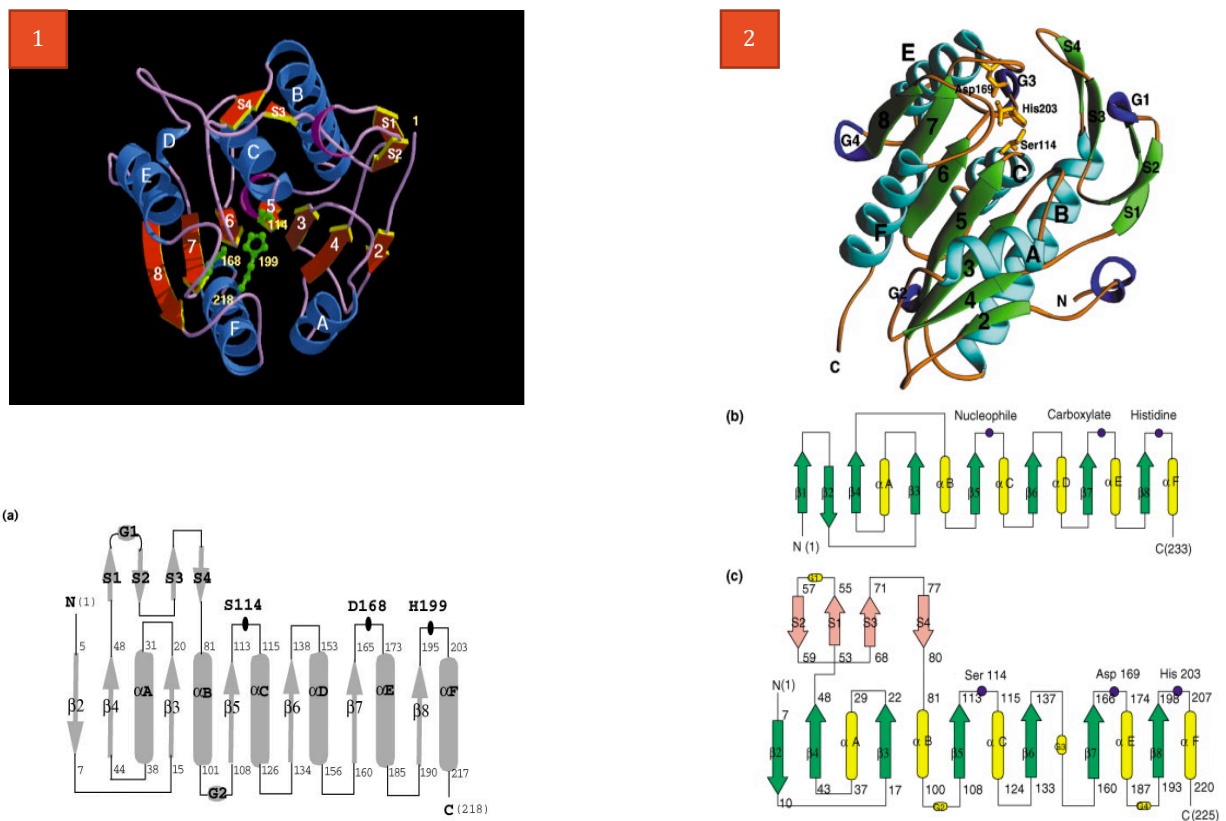


Figure 47 : Comparaison de la structure cristalline des orthologues de la TbPLA1b dans le *Pseudomonas aeruginosa* et dans l'Homme

D'après (Kim et al. 1997) et (Devedjiev et al. 2000) : A gauche en 1, cristallisation de la PLA1b chez *Pseudomonas fluorescens* et à droite en 2, cristallisation de PLA1b humaine.

Dans la Figure 47, on remarque une organisation identique des différents hélices et feuillet. De même, le site catalytique est extrêmement bien conservé, avec une sérine catalytique positionnée exactement au même endroit pour les deux protéines et très peu de décalage pour les deux autres acteurs (acide aspartique et histidine) de la triade. La

très haute conservation de cette protéine dénote d'une activité fondamentale au sein de la cellule.

Grâce à un logiciel en ligne « I-TASSER » (Roy, Kucukural, et Zhang 2010) nous sommes en capacité de prédire la structure que pourrait avoir TbPLA1b et si elle ressemble aux protéines orthologues déjà cristallisées (Yang et Zhang 2015).

La protéine qui possède la plus grande analogie de structure avec TbPLA1b est la protéine 1fj2A, une protéine humaine classée EC 3.1.4.39, ou alkylglycérophosphoéthanolamine phosphodiesterase, une lysophospholipase. Cette protéine est la structure 2 de la Figure 47.

N'ayant pas été décrite dans le parasite qui nous intéresse, cette activité reste très singulière, d'autant que certains auteurs avaient déjà mentionné dans le passé une activité lysophospholipase dont on ne connaît pas encore la provenance (Sage et al. 1981).

Un autre outil développé par le Dr.Tinti (Tinti et al. 2019) permet de connaître le protéome des parasites à chaque moment du cycle cellulaire et notre protéine semble exprimée de manière constante et homogène tout le long du cycle (Figure 48). Nous ne pouvons cependant pas conclure à son activité durant le cycle, la protéine pouvant subir certaines modifications la rendant parfois active ou au contraire inactive.

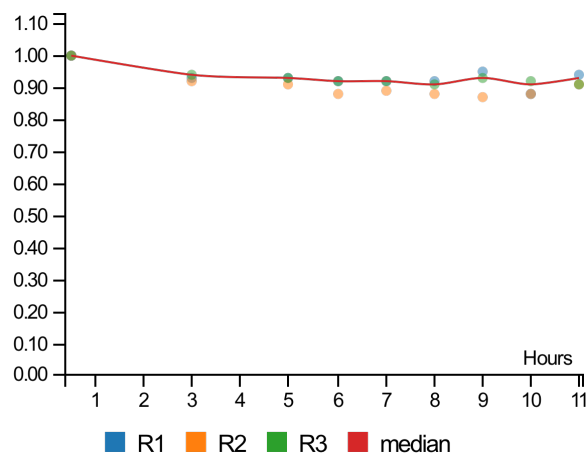


Figure 48 : Evolution de l'expression de TbPLA1b au cours du cycle cellulaire selon le Dr. Tinti

Dans les trois réplicats de cette expérience, TbPLA1b est constante dans le temps. Le temps de doublement d'un trypanosome de forme sanguine est de 7h et on observe ici qu'il n'y a pas de différence entre la phase G1,S et G2-M. Le niveau d'expression reste identique.

1.3 Etudes expérimentales complémentaires.

1.3.1 Etude de la croissance de de 427 possédant 3 allèles de TbPLA1b.

Après les études portant sur la lignée KOTbPLA1b (voir article) reflétant son activité non essentielle à la survie du parasite en condition de culture classique, il nous a paru judicieux de tester si la protéine, exprimée en plus grande quantité, pouvait avoir une activité toxique pour le parasite. En effet, comme nous l'avons précisé plus tôt, la régulation de la quantité de lysophospholipides doit être contrôlée de manière très fine car en trop grande quantité ils peuvent être toxiques pour la cellule (Plemel et al. 2018). Nous avons donc effectué une expérience de surexpression (Figure 49) avec les différentes versions de TbPLA1b présentes dans l'article.

Cette expérience consiste en la réintroduction par l'intermédiaire d'un pLew100, d'un allèle de TbPLA1b, tagué en N-terminal par un Ty-Tag dans les souches WT 427 du *Trypanosoma brucei brucei*. Nous avons étudié la croissance des lignées cellulaires obtenues. Des western-blot (WB) nous ont permis de vérifier la présence de la protéine et de conclure que sa surexpression n'était pas toxique pour le parasite. Il est important de noter que, bien que les protéines réintroduites soient adressées à des compartiments distincts, cela ne change pas la croissance des parasites.

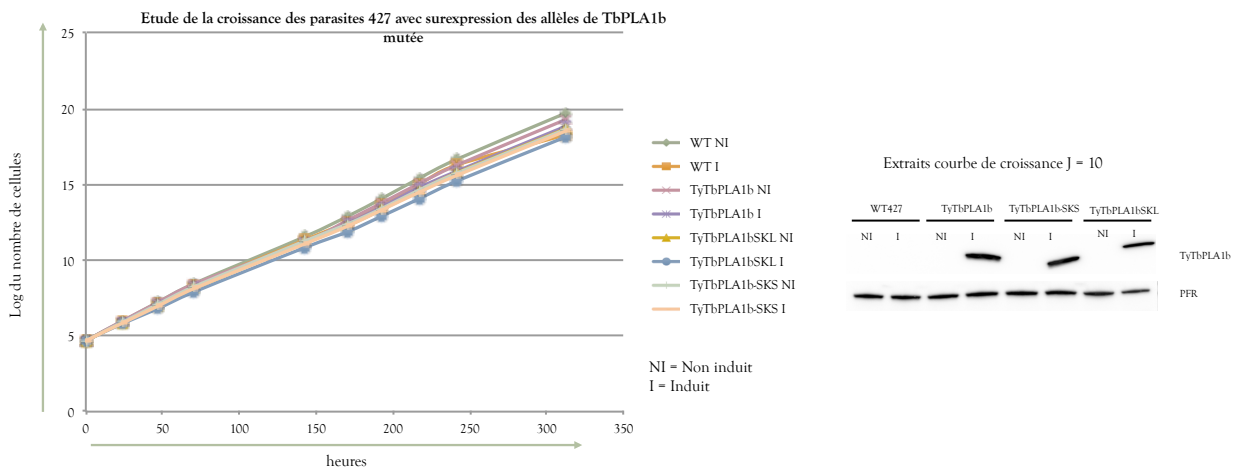


Figure 49 : Etude de la croissance des parasites 427 avec surexpression des allèles de TbPLA1b mutés.

Les courbes comportant un + ont été cultivées avec de la tétracycline tandis que celles avec un - sont cultivés en milieu non induit. Le WB a été réalisé à J=10 de la courbe de croissance ci-à-côté.

La Figure 49 montre que les parasites ne semblent pas être affectés par la présence d'une plus grande quantité de TbPLA1b en condition de culture standard.

Cela suggère plusieurs hypothèses :

- L'activité PLA1 de la protéine est très faible et donc n'influence pas l'homéostasie du parasite en conditions de culture.
- Il y a une régulation interne et la présence de la protéine ne prévaut pas de son activité. On pourrait penser que la protéine pourrait être inactivée.
- La protéine est sécrétée si elle est en trop grande quantité dans le parasite.
- La protéine est stockée dans les glycosomes.

1.3.2 Répartition de TbPLA1b

Nous avons posé l'hypothèse que les glycosomes pouvaient être un compartiment de stockage saturable. Cela impliquait que si l'hypothèse était juste, nous verrions une plus grande quantité de protéines dans le cytoplasme du parasite ou sécrétées dans le milieu extérieur mais toujours la même quantité dans le glycosome. Pour vérifier cette hypothèse nous avons réalisé deux expériences de fractionnement, l'une par une méthode de lyse hypotonique et l'autre grâce à un détergent, la digitonine.

1.3.3 La lyse hypotonique

A l'aide d'un tampon hypotonique qui entraîne la lyse des parasites, nous avons pu fractionner les protéines solubles (S) du parasite et les protéines non solubles (NS). Les protéines contenues dans les compartiments cellulaires comme la mitochondrie ou les glycosomes ne sont pas affectées par ce tampon.

Par conséquent, on trouvera automatiquement ces protéines dans la fraction non soluble. Il faut noter ici que l'anticorps qui révèle TbPLA1b, révèle à la fois la protéine native, qui va se retrouver à une taille moindre que TbPLA1b tagguée, et la protéine tagguée. En effet cette dernière est plus lourde (31kD) car elle comporte un Ty-tag en plus de la séquence originelle.

La Figure 50-1, montre à J6 d'induction à la tétracycline, la présence de la protéine surexprimée dans les différents compartiments. Deux notions sont alors à prendre en compte ; 1/ La quantité de protéine native et sa répartition ; et 2/ la quantité de protéine surexprimée et sa répartition.

La Figure 50-2 permet de quantifier cette répartition que l'on observe visuellement sur la partie 1 par rapport à une moyenne hypothétique de répartition. C'est-à-dire que si on avait 50% de répartition de la protéine dans chaque extrait entre le culot et le surnageant, les plots des graphiques représentant les culots et les surnageants seraient alignés sur le plot « moyenne culot + surnageant ». Cela n'est pas le cas ici, en effet dans la partie 2-A, on observe clairement une distribution hétérogène de la protéine surexprimée. La surexpression de TyTbPLA1bSKL la dirige de manière quasi totale dans les glycosomes, tandis que TyTbPLA1b-SKS reste en quasi totalité dans le cytoplasme. Toujours en comparant par rapport à la moyenne d'expression totale de la protéine, concernant TbPLA1b native (Figure 50, 2-B), on observe que sa répartition est presque parfaitement homogène entre la quantité de TbPLA1b dans les glycosomes et celle présente dans le cytoplasme. On peut poser ici trois conclusions :

- la surexpression de la TbPLA1b n'induit pas de modification de la distribution de la protéine native.
- Les signaux d'adressage SKL ou SKS ont une efficacité indéniable sur la compartimentalisation des protéines.
- Les glycosomes ne semblent pas être saturés en TbPLA1b.

Cependant, de manière intéressante, la protéine TyTbPLA1b-SKS (pour laquelle le site d'adressage au glycosome a été tronqué), en présence de la protéine native, peut se retrouver en quantité minime dans les glycosomes. On peut suggérer que TbPLA1b peut former un hétéropolymère de la version native TbPLA1b et mutée TbPLA1b-SKS avant d'entrer dans le glycosome. Cela permettrait à la version mutée incapable de se localiser par elle-même dans le glycosome de s'y retrouver. Une éventuelle redondance entre les différentes PLA1 du trypanosome africain nous a poussé à comparer TbPLA1b avec TbPLA1a, protéine déjà décrite au préalable par T. Smith et étant cytosolique (Richmond et Smith 2007a). L'hypothèse portait sur le fait que le cytoplasme ne peut contenir qu'une quantité définie de protéine à activité PLA1. En conséquent, pour réguler cette activité, il faudra que le parasite se débarrasse d'une partie des enzymes porteuses de cette activité si la quantité de PLA1 augmente.

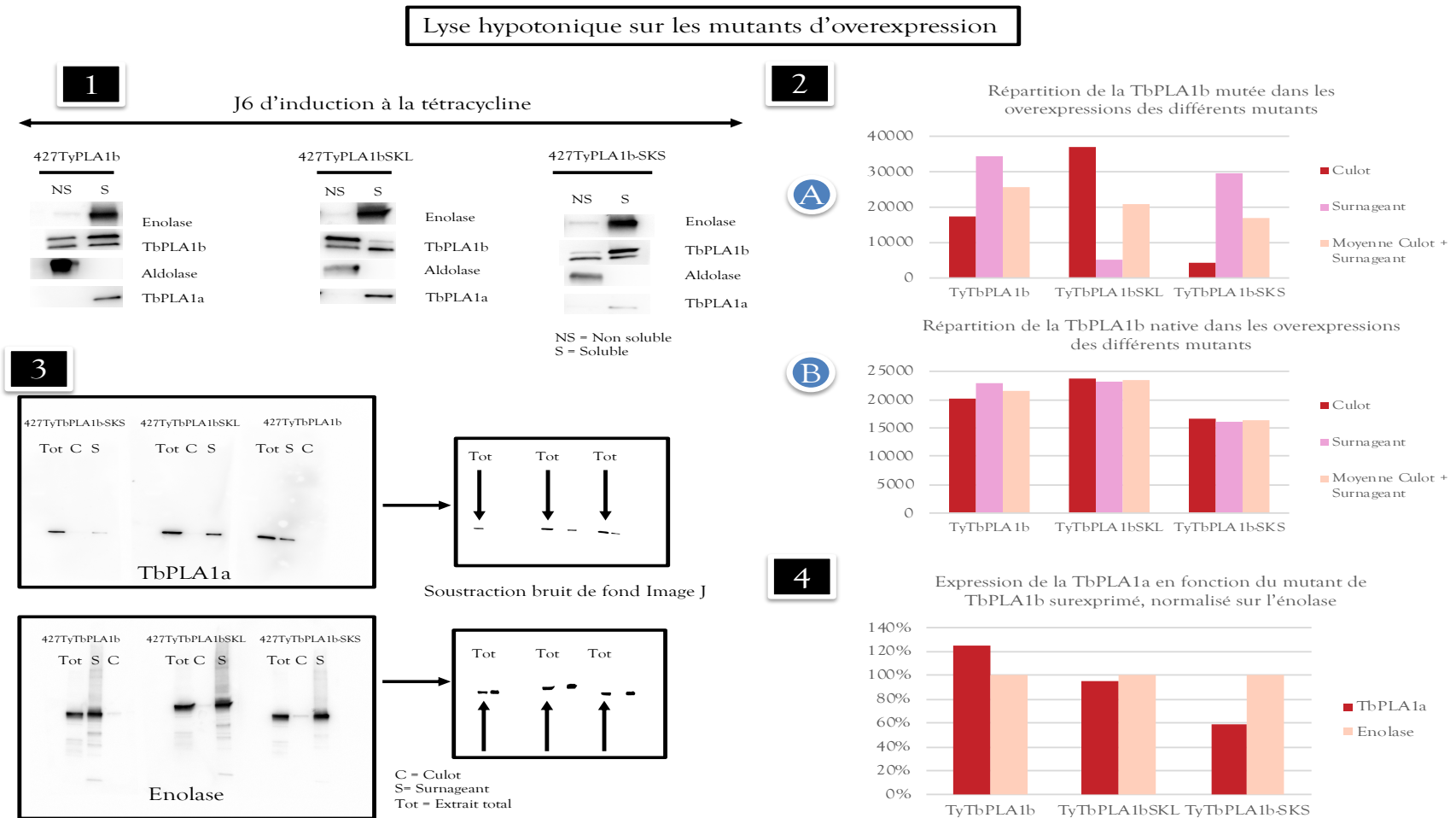


Figure 50 : Lyse hypotonique sur les mutants de surexpression des différentes versions de la TbPLA1b et analyse quantitative de la quantité de TbPLA1a par rapport à la quantité totale de protéine.

1-Expérience de lyse hypotonique des différents mutants avec les marqueurs cytoplasmique (énolase), glycosomal (aldolase), la TbPLA1b native à 28 kD, la TbPLA1b surexprimée et mutée à 31 kD à J6 d'induction à la tétracycline et la TbPLA1a. 2- Analyse comparative de la répartition de la TbPLA1b dans les différents compartiments en fonction du mutant de localisation. 3- Western blots natifs des TbPLA1a et énolase pour lesquels on a sorti le bruit de fond grâce au logiciel Image J. 4- Quantification grâce à Image J de la quantité de TbPLA1a totale comparée à la quantité d'énolase totale selon le mutant TbPLA1b de surexpression.

Nous avons donc quantifié la protéine TbPLA1a dans chaque extrait des mutants possédant un allèle surnuméraire (Figure 50-3). La quantité de protéine TbPLA1a de chaque extrait total a été ajustée à la quantité d'énolase, témoin de charge, afin d'obtenir un pourcentage de présence de TbPLA1a dans les différents mutants de surexpression précédemment décrits (Figure 50-4). On observe qu'en présence de la TyTbPLA1b-SKS surnuméraire (protéine uniquement cytosolique), la quantité de TbPLA1a est de 60% la quantité d'énolase tandis que la surexpression de TyTbPLA1b, qui peut aussi aller dans les glycosomes, et de 120%. Cette différence pourrait être attribuée au fait que la quantité de TbPLA1a est régulée en fonction de la quantité de TbPLA1b.

1.3.4 Fractionnement à la digitonine

Les premiers résultats de la lyse hypotonique nous ont suggéré que TbPLA1b pouvait se polymériser avant d'entrer dans les glycosomes, ce qui expliquerait la présence de la TyTbPLA1b-SKS dans ces compartiments bien qu'elle n'ait plus de site d'adressage. Nous pouvons exclure l'existence d'un hétéropolymère, en effet la protéine TyTbPLA1b-SKS exprimée dans le KOTbPLA1b est uniquement cytosolique, confirmant l'indépendance de TbPLA1b pour entrer dans les glycosomes (ne nécessite pas l'action d'une autre protéine) (cf Article soumis).

Nous avons donc effectué une expérience de digitonine afin d'observer plus précisément la localisation de la TyTbPLA1b-SKS dans un contexte où l'allèle TbPLA1b natif est encore présent (Figure 51).

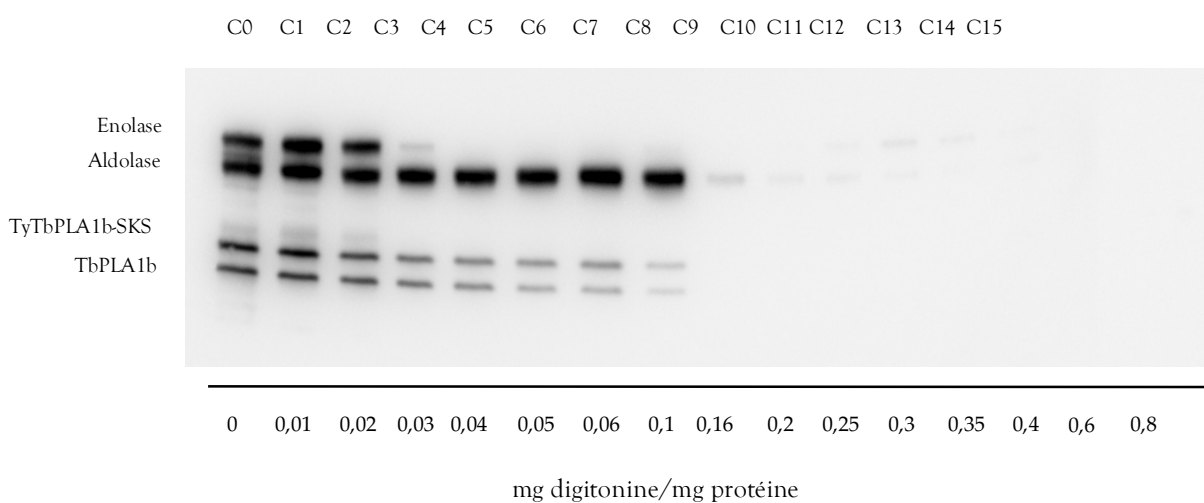


Figure 51 : Fractionnement à la digitonine des parasites 427+TyTbPLA1b-SKS

La figure montre les culots traités avec des concentrations croissantes de digitonine. L'énolase est le marqueur cytoplasmique et l'aldolase le marqueur glycosomal.

La protéine tronquée pour le site d'adressage aux glycosomes (-SKS) qui, dans la lignée KOTbPLA1b ne peut pas atteindre ce compartiment, le peut dans les conditions de présence des allèles natifs, au même titre que la TbPLA1b endogène. Cette expérience confirme donc notre hypothèse d'homopolymérisation. La question suivante est de trouver sous quelle conformation TbPLA1b est prise en charge par les systèmes d'import aux glycosomes. Deux autres expériences ont apporté des réponses à ce questionnement.

1.3.5 Analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC)

La protéine TbPLA1b a été exprimée de manière hétérologue dans un système bactérien sur des *E. Coli* BL21. Cette protéine purifiée a été analysée par une chromatographie liquide afin de voir si nous obtenions différents points de rétention du produit, autrement dit, diverses conformations de la protéine (Figure 52).

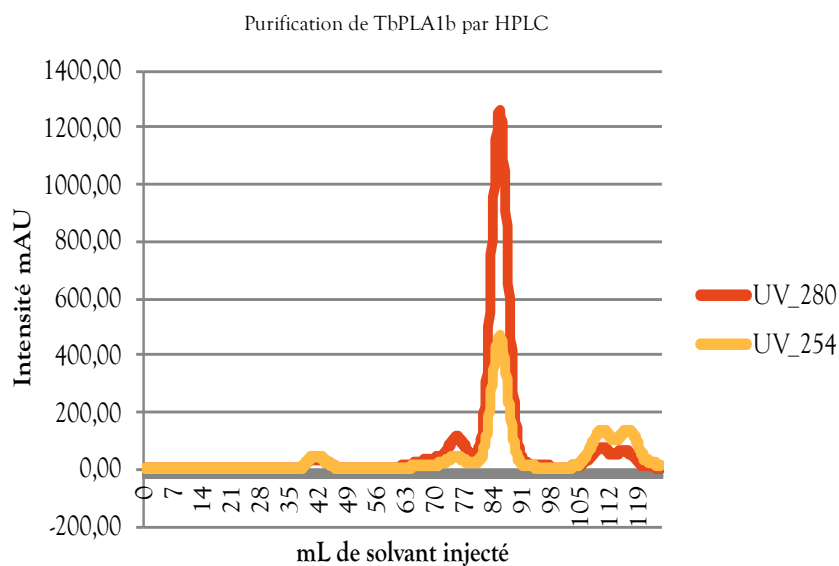


Figure 52 : Etude par HPLC de la TbPLA1b

La courbe 280 représente la rétention de la TbPLA1b, seule protéine présente dans l'échantillon. La courbe 254 montre les contaminants, notamment les acides nucléiques.

Ce que nous avons pu observer est l'apparition de deux pics distincts. Un premier petit pic, correspondant à une forme polymère, probablement dimérique, et un second grand pic, correspondant à une forme monomère, en plus grande quantité. Il est intéressant de savoir que cette protéine a la faculté de prendre une conformation autre que monomérique à l'intérieur de la bactérie.

1.3.6 Analyse par gel natif

Un gel natif, non dénaturant a été réalisé sur la souche Antat sauvage du parasite afin d'observer le poids que pouvait avoir le polymère de la TbPLA1b. Les mêmes dépôts ont été effectués sur un même gel afin d'en colorer une partie avec de l'Instant Blue®, comportant le marqueur de charge et de faire un WB sur l'autre partie, sur laquelle nous n'avions pas de marqueur de charge. On peut supposer que la migration étant la même, nous aurions donc un marqueur sur le WB (Figure 53).

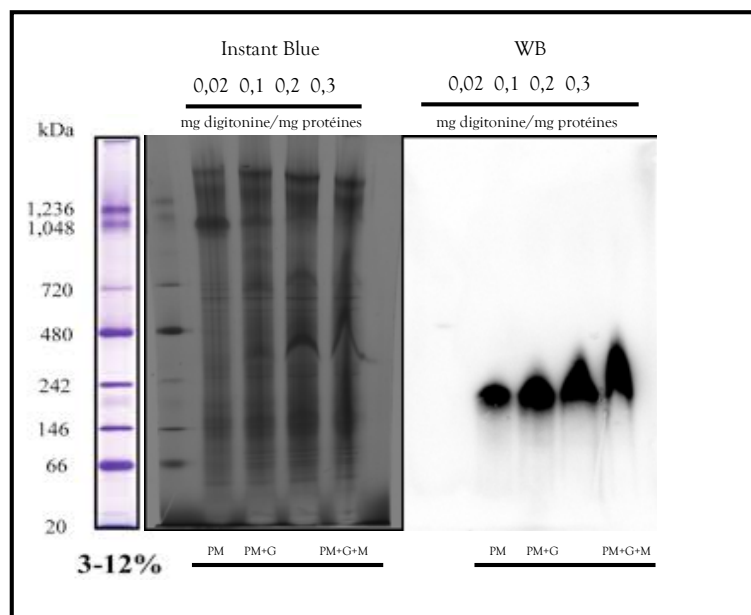


Figure 53 : Gel natif par extraction à la digitonine de parasites Antat sauvages.

La partie gauche de la figure montre la coloration à l'Instant Blue® après extraction avec des quantités croissantes de digitonine. Les mêmes extraits (surnageants) sont testés en WB avec un anticorps révélant TbPLA1b. PM : Membrane plasmique, G = glycosome et M = mitochondrie.

On observe sur la Figure 53, que l'homodimère pèse environ 242 kDa. Ceci correspond à 8 TbPLA1b. Autrement dit, cette phospholipase particulière aurait la capacité de former des octamères de protéine. Cette disposition est étonnante pour une phospholipase (Kingma et Egmond 2002), en effet la plupart sont retrouvées sous forme de dimère.

1.3.7 Possible voie de sécrétion de TbPLA1b

Puisque nous avons à disposition les mutants d'adressage de TbPLA1b, nous avons voulu tester quelle était la fraction de TbPLA1b sécrétée dans les parasites. Deux voies de sécrétion étaient possibles. La première voyait la partie cytoplasmique de TbPLA1b sécrétée dans le milieu extérieur, grâce à la poche flagellaire. La deuxième pouvait

consister en l'excrétion des glycosomes. Cependant, il est important de souligner que selon l'analyse du sécrétome, seulement 8% des protéines du protéome glycosomal se retrouvent dans le sécrétome (Geiger et al. 2010), ce n'est donc pas la piste principale d'étude. Pourtant, le renouvellement des glycosomes est constant dans le parasite, selon ses besoins énergétiques, ils sont recyclés par le système endolysosomal, par pexophagie (Bauer et Morris 2017). Or, des études ont montré que des vésicules de sécrétion pouvaient se détacher du parasite, impliquant la sécrétion dans le milieu extérieur de certaines protéines par la voie de ces vésicules. Nous avons donc effectué une expérience de excrétion/sécrétion avec les différents mutants, afin de déterminer quelle fraction était sécrétée (Figure 54).

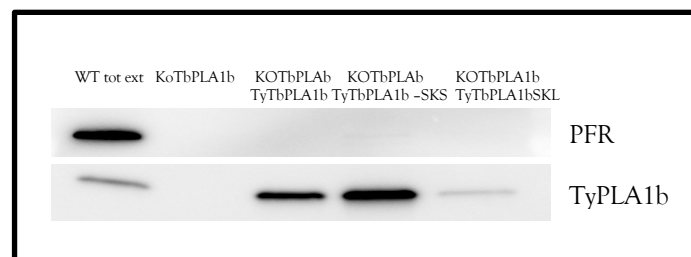


Figure 54 : Western blot de la sécrétion de la TbPLA1b dans les différents mutants de la lignée KOTbPLA1b

Dans le KOTbPLA1b, réexpression des différentes versions de la TyTbPLA1b et mise en condition de sécrétion des parasites. Le total de parasite WT est à une concentration de 10^5 cellules /mL. Révélation TbPLA1b par anti-TbPLA1b. PFR = Paraflagellar rod, protéine non sécrétée.

Le résultat de notre expérience, montre que TyPLA1bSKL qui possède un site canonique d'adressage aux glycosomes semble moins sécrétée que TyTbPLA1b-SKS qui est entièrement cytoplasmique. On peut donc supposer que c'est la partie cytoplasmique du pool de TbPLA1b natif qui est sécrétée par le parasite. Le glycosome jouerait un rôle de stockage ou TbPLA1b aurait une activité encore inconnue dans les glycosomes. Cette expérience mérite d'être renouvelée avec un contrôle de sécrétion comme l'énolase par exemple. En parallèle nous avons effectué le sécrétome des cellules Antat que nous avons analysé en protéomique et dans lequel nous retrouvons la TbPLA1b.

1.3.8 Analyses complémentaires de TbPLA1b : conclusion générale

Pour conclure sur TbPLA1b, on peut lui prêter une localisation originale bi-compartimentale, à la fois cytoplasmique et glycosomale, affectée à ce compartiment particulier par un PTS-1 de faible affinité qu'est le SKS. Sa structure quaternaire est aussi

atypique puisqu' elle semble se conformer en octamère. La sécrétion de cette protéine semble passer par le pool d'enzyme cytoplasmique et non glycosomale, confirmant les hypothèses du Dr. Geiger (Geiger et al. 2010). La présence de certaines protéines du protéome du glycosome dans le sécrétome du parasite pourrait s'expliquer, comme c'est le cas ici, par une bi-compartmentalisation de certaines protéines.

Pour observer la structure moléculaire de la protéine, nous avons essayé de cristalliser TbPLA1b avec l'aide du Dr. Paul Lesbats. Nous avons seulement pu obtenir un très petit cristal. Après avoir essayé avec une plus grande quantité de protéine et de mélange de précipitation, nous n'avons hélas pas pu obtenir plus de cristaux. La cristallisation d'une protéine est un processus complexe mettant en jeu beaucoup de paramètres. Il nous reste encore un grand nombre de conditions à tester pour espérer obtenir des cristaux exploitables. Une approche complémentaire pour étudier la structure pourrait être le recours à la cryomicroscopie électronique, technologie développée au laboratoire par le Dr Rémi Fronzes.

1.3.9 Les expériences et les analyses de lipidomique

Les analyses lipidomiques ont été effectuées dans un laboratoire partenaire à St Andrews en Ecosse afin de déterminer la spécificité de substrat et l'activité de la TbPLA1b.

1.3.9.1 La lipidomique globale sur lysat de cellule.

Tout d'abord, des analyses de la composition lipidique des différents mutants ont été réalisées à partir d'extraits totaux. C'est-à-dire que l'ensemble du spectre lipidique a pu être observé pour chaque parasite.

Tous les mutants de localisation des 427 KOTbPLA1b présents dans la publication (TyTbPLA1b, TyTbPLA1b-SKS, TyTbPLA1bSKL) ainsi que les cellules sauvages Antat et 427 et les Antat1173 KOTbPLA1c, AntatKOTbPLA1b et Antat1173KOTbbLa ont été testés. Il est important de rappeler qu'au cours de notre étude, nous avons pensé judicieux de travailler sur la souche Antat qui induit une symptomathologie moins sévère chez la souris et permet l'étude plus approfondie de facteurs de virulence putatifs.

Malheureusement, les différents spectres analysés ne nous ont pas permis d'élaborer d'hypothèse quant à l'activité des différentes lipases. Une partie de cet échec pourrait s'expliquer par la complexité de la reproductibilité de la technique et l'adaptabilité très importante des parasites. En effet, ces derniers pourraient compenser la perte d'une lipase par l'action d'une autre lipase qui posséderait la même activité.

1.3.9.2 Les analyses de lysats d'Antat sauvage supplémentés en TbPLA1b

Afin de remédier à cette adaptation systématique du parasite, nous avons imaginé une nouvelle expérience qui consiste à incuber les extraits de parasites, contenant ses propres lipides, avec notre protéine recombinante.

Le surplus d'enzyme induit une modification des spectres, reflet des lipides hydrolysés par la TbPLA1b. En effet, chaque pic correspond à un lipide particulier et la disparition d'un pic est synonyme de la lyse du lipide correspondant. L'avantage de cette méthode réside dans le fait que les enzymes ont ainsi à leur disposition dans le lysat, leur(s) substrat(s), leur(s) partenaire(s) métabolique(s) et leur(s) co-facteur(s) éventuel(s).

Cependant, cette expérience n'est pas sans faille, car nous savons que les phospholipases ne sont pas des enzymes à activité très spécifique. En trop grande quantité, elles pourraient détruire plus que les lipides qu'elles coupent en conditions natives. Néanmoins, même si elles peuvent couper plusieurs substrats, il demeure une sorte de spécificité dans le sens où une enzyme à activité PLA1 aura rarement une activité PLA2, sauf si c'est une PLB.

L'analyse des différents graphiques obtenus pour cette expérience doit se faire par étape. La quantité de phospholipides est immense dans le parasite et il est donc très difficile d'observer des diminutions de pics. De plus, l'extraction des lipides est toujours différente il est donc important de faire les extractions pour chaque échantillon au même moment.

Parce que nous suspectons l'activité lysophospholipase de TbPLA1b, nous nous sommes intéressés à la disparition éventuelle de certains lysophospholipides. En moins grande quantité que les phospholipides, l'action d'une quantité conséquente d'enzyme pourrait être visible au niveau des spectres. Il est à noter que la seule analyse

interprétable est celle des lipides de la famille des phosphatidylcholines. Les autres types de glycérophospholipides n'ont pas donné de résultats exploitables. Nous tenons à souligner que tous ces résultats sont préliminaires et que ces expériences doivent être reproduites pour amener à une conclusion valable des activités.

1.3.9.2.1 Validation du profil des Antat WT et de la méthodologie

La première étape a été d'observer le spectre lipidique des cellules Antat WT (contrôle négatif) (Figure 55), qui possèdent deux copies de TbPLA1b.

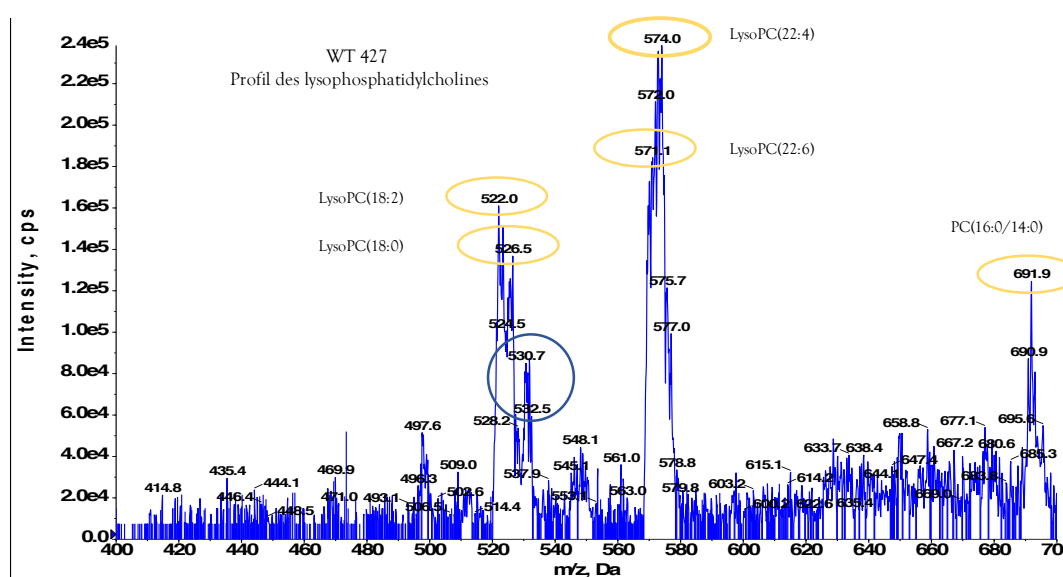


Figure 55 : Spectre lipidique des parasites Antat WT

Entouré en bleu nous avons l'étalon interne SPLASH LIPIDOMIX® et en jaune les lysophospholipides du parasite. Cela est valable pour tous les graphiques de la partie lipidomique.

On observe que dans ces conditions natives, il y a présence de lysophospholipides provenant de PC de courtes chaînes (<36 carbones) comme le lysoPC (18 :2) au pic 522 et le LysoPC(18 :0) au pic 526.5. En conditions normales, on peut imaginer qu'il y a dans la cellule une quantité faible de lysoPC toujours présente.

Pour valider l'activité des enzymes dans les conditions de l'expérience, nous avons testé une PLA2 de pancréas de bœuf industrielle, pour observer un changement de constituants lipidiques (Figure 56). En effet, si ce profil avait été le même que le profil WT, nous n'aurions pas pu conclure sur la suite des expériences.

On observe ici que le profil est modifié avec l'apparition de pics particuliers sous l'effet de la PLA2 comme le LysoPC (24:0) au pic 605,5. On peut donc conclure que les variations potentielles que nous verrons sous l'action de TbPLA1b devraient être dues à la présence en excès de cette dernière. Les LysoPC que nous avons retrouvé sont ceux qui ne possèdent pas de doubles liaisons dans leur chaîne aliphatique.

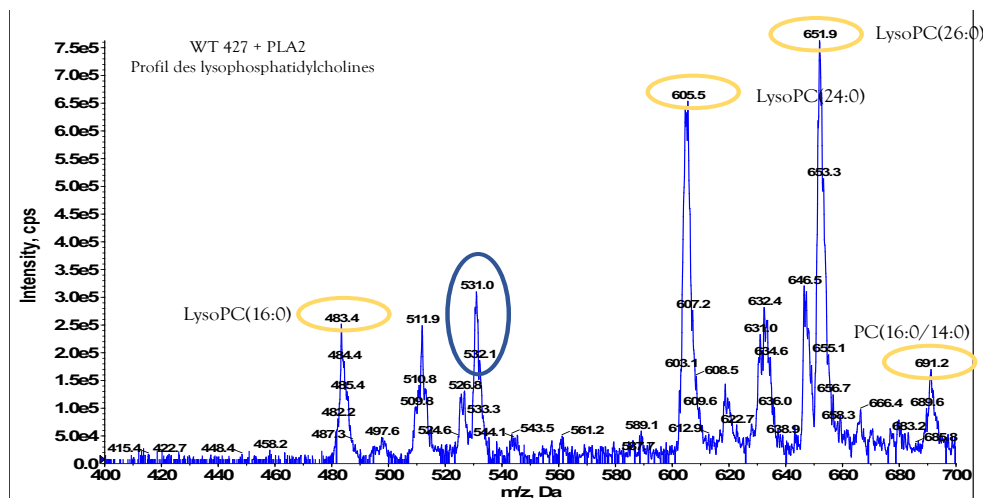


Figure 56 : Spectre lipidique des parasites Antat WT supplémentés en PLA2 bovine

1.3.9.2.2 Comparaison des Antat WT avec les Antat KOTbPLA1b

On observe que le profil lipidique entre les cellules KOTbPLA1b et WT 427 est quasiment le même. Selon notre hypothèse, il semblerait donc qu'une autre protéine ait les mêmes capacités enzymatiques que TbPLA1b, permettant au profil des lysophospholipides de rester le même (Figure 57). Deux questions se posent à ce stade :

- Quelle est l'enzyme qui possède la même fonction que TbPLA1b et qui prend sa fonction métabolique quand cette dernière est indisponible ? Il est à noter qu'aucune protéine possédant de fonction similaire putative n'a été retrouvée dans les analyses protéomiques. Une des raisons pourrait être que cette protéine remplaçante a une très forte activité catalytique et le parasite n'aurait pas la nécessité de la surexprimer pour obtenir l'activité TbPLA1b.
- Quelle est l'activité de TbPLA1b ?

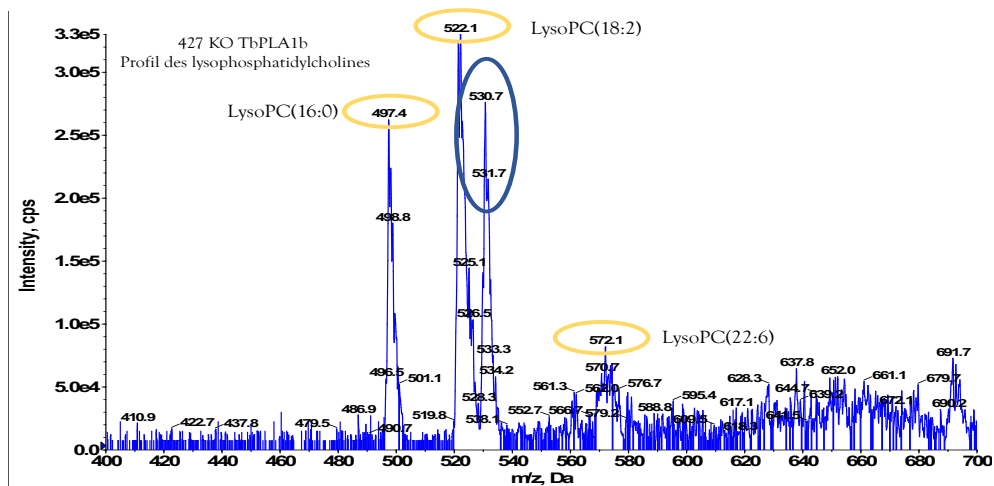


Figure 57: Spectre lipidique des parasites Antat KOTbPLA1b

1.3.9.2.3 Comparaison des Antat sauvages et des Antat supplémentés en TbPLA1b

Afin de répondre à cette deuxième question, nous avons ajouté en excès TbPLA1b sur les lysats de parasites (Figure 58).

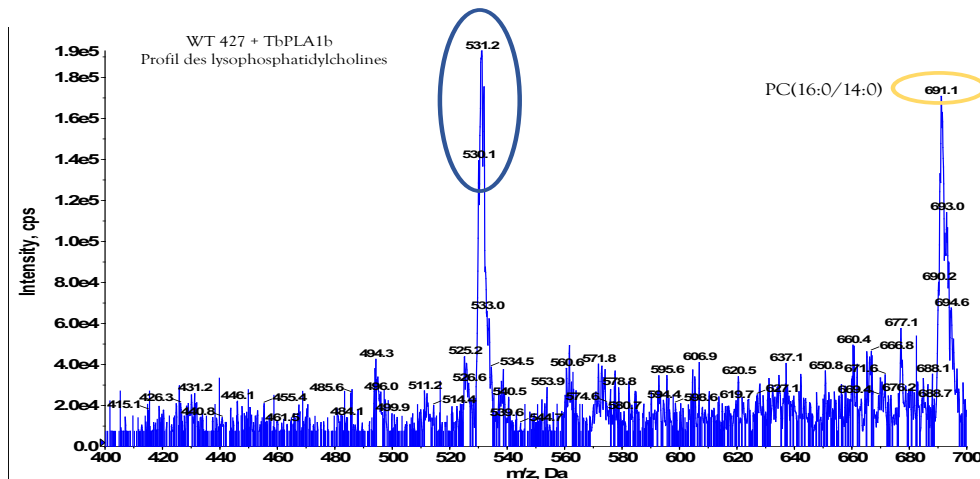


Figure 58: Spectre lipidique des parasites Antat WT supplémentés en TbPLA1b

Les résultats que nous observons ici montrent la disparition de certains lysophospholipides présents dans les cellules Antat comme par exemple le lysoPC (18 :2) au pic 522 et le lysoPC(18 :0) au pic 526.5 mais aussi les lysoPC (22 :4) et (22 :6). La disparition de ces lysoPC pourrait aller dans le sens d'une activité lysophospholipase

de TbPLA1b. Activité retrouvée pour les orthologues de TbPLA1b dans d'autres microorganismes et chez l'Homme.

D'autre part il est possible que TbPLA1b ne coupe pas que les lipides de la famille des PC mais aussi ceux d'une autre famille de Glycérophospholipides. Comme nous l'avons vu dans les expériences d'activité de l'article en révision, TbPLA1b coupe les phosphatidyléthanolamines (présent dans le kit EnzCheck®), ce qui lui confère aussi une activité PLA1. Cependant les résultats de ces expériences de lysats méritent d'être répétés avant d'être certains de l'activité lysophospholipase.

Une hypothèse originale serait que TbPLA1b qui possède de multiples localisations, puisse avoir des activités différentes selon le compartiment, dépendant plutôt des lipides à disposition que de l'activité propre de l'enzyme. Dans les lysats de cellules, tous les compartiments sont mélangés on ne peut donc pas discriminer la fonction. Il serait intéressant de répéter ces expériences en étudiant chaque compartiment cellulaire, sa structure en lipides et les activités des lipases sur ces compartiments.

2 TbPLA1c

2.1 Analyses in silico

2.1.1 Généralités

Le deuxième candidat étudié durant cette thèse est la protéine dont la dénomination est Tb927.9.12700. Dans la banque de données génomiques des trypanosomes, TriTrypDB, elle est annotée Phospholipase A1 et c'est pourquoi nous avons retenu ce candidat. Nous l'avons nommé durant ma thèse TbPLA1c. Cette protéine possède 447 acides aminés et pèse 49,9 kD. Il est important de noter que cette protéine a aussi une annotation PLA2 pour la souche 427 du *Trypanosoma brucei brucei* et pour *Trypanosoma brucei gambiense* sur TriTrypDB.

2.1.2 Recherche d'orthologues et comparaison de séquences.

Grâce à des analyses *in silico* nous avons pu retrouver deux orthologues intéressants de TbPLA1c (Q38DE4). Le premier chez l'Homme (Q13093) et le deuxième chez le chien (Q28262) (Figure 59). Ces orthologues possèdent le même pentapeptide catalytique sur les trois enzymes, c'est à dire une version G-X-S-X-G qui prend ici la forme G-H-S-F-G. Nous ne pouvons pas définitivement statuer sur le reste de la triade catalytique car les analyses structurales n'ont pas permis de les distinguer. Cependant, on compte deux histidines conservées et six acides aspartiques sur les séquences homologues. L'acide aspartique le plus probablement mis en jeu dans la triade catalytique serait l'acide aminé 344 de la séquence consensus de la Figure 59 (Tjoelker et al. 1995). D'autres zones, peut-être utilisées pour la liaison au substrat sont conservées aussi, comme la séquence VSFHGL. Le pentapeptide actif de cette protéine se retrouve au tiers terminal de la protéine.

Le logiciel I-Tasser nous a permis de modéliser la structure de TbPLA1c et de la comparer à des structures de protéines similaires déjà cristallisées. La protéine la plus proche de la TbPLA1c est la protéine Q13093 humaine (gène PLA2G7). Elle est annotée comme platelet-activating factor acétylhydrolase, EC 3.1.1.47. Elle hydrolyserait préférentiellement les lipides à groupe de tête choline. Cette protéine serait une forme particulière de PLA2. Elle est en effet trop lourde pour être une PLA2 sécrétée et possède un pentapeptide catalytique typique des lipases neutres. Ce qui fait d'elle un hybride entre une PAF et une PLA2 calcium dépendante sécrétée (Tjoelker et al. 1995).

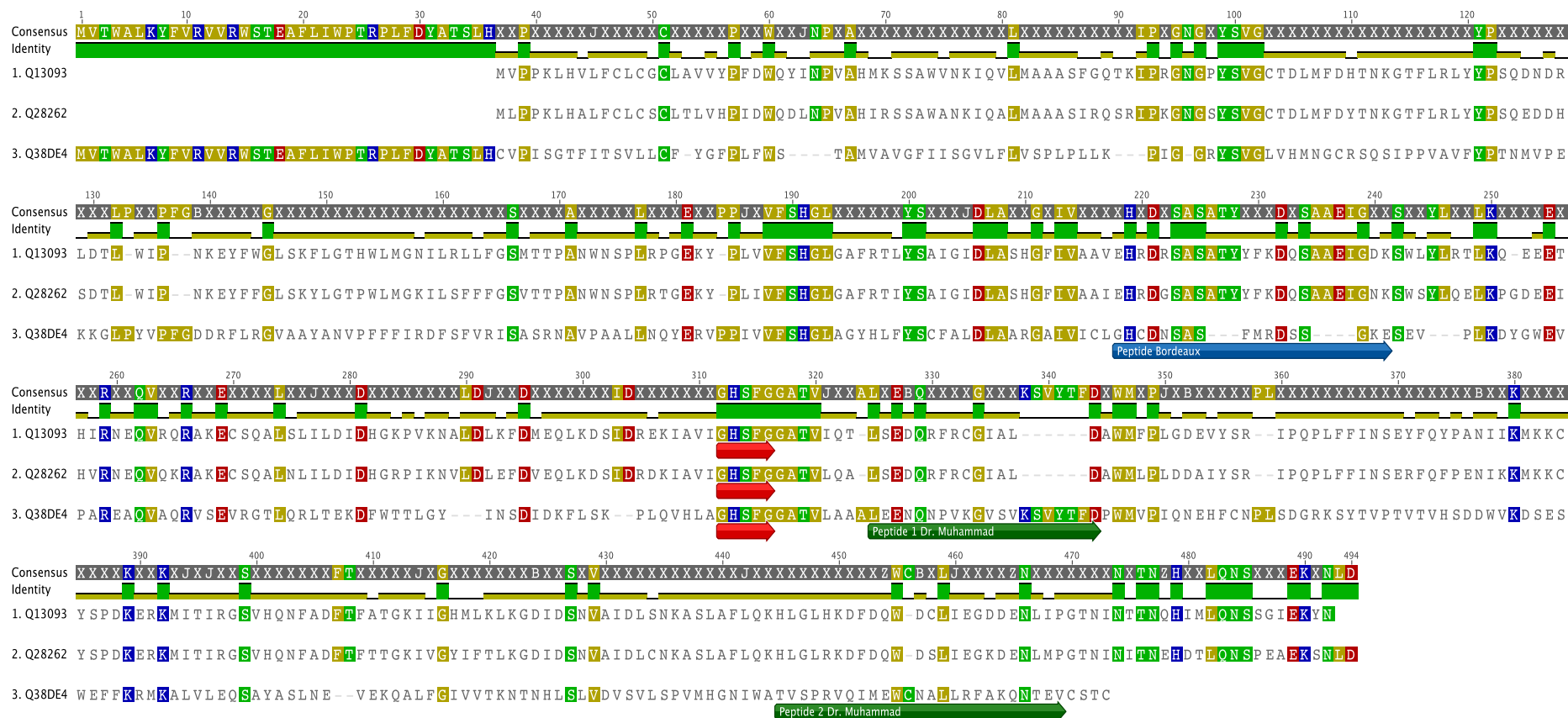


Figure 59 : Alignement TbPLA1c de l'Homme, du chien et du trypanosome africain avec le logiciel Geneious

Le pentapeptide catalytique est représenté par une flèche rouge. En bleu, peptide sélectionné pour la création d'anticorps dirigés contre TbPLA1c. En vert, les deux peptides utilisés dans la même intention par le Dr. Muhammad. Q38DE4 = TbPLA1c trypanosome, Q13093 PLA1c humaine, Q28262 = PLA1c chien.

2.1.3 Localisation de TbPLA1c

2.1.3.1 Étude de la séquence

D'après le site TriTrypDB, TbPLA1c possède un peptide signal qui permet son adressage à la membrane et possiblement son envoi dans le milieu extracellulaire ainsi qu'un domaine transmembranaire (Figure 60). Ce domaine transmembranaire a aussi été prédit par le site [Outcyte](#) avec un score de 0,9973. La protéine parasitaire n'est pas prédite pour avoir un peptide signal alors que la protéine humaine, l'est, pour un score de 0,896. Ceci peut s'expliquer par les limites du logiciel qui ne prend en compte que les 70 premiers acides aminés pour prédire le site dans lequel le peptide signal pourrait se trouver. Cependant, on peut observer sur l'alignement (Figure 59) que TbPLA1c possède déjà 36 AA de plus que son orthologue humaine. Ce signal peut donc logiquement se trouver après. Tronquer la protéine de ses 36 premiers acides aminés ne change cependant rien à la prédiction.

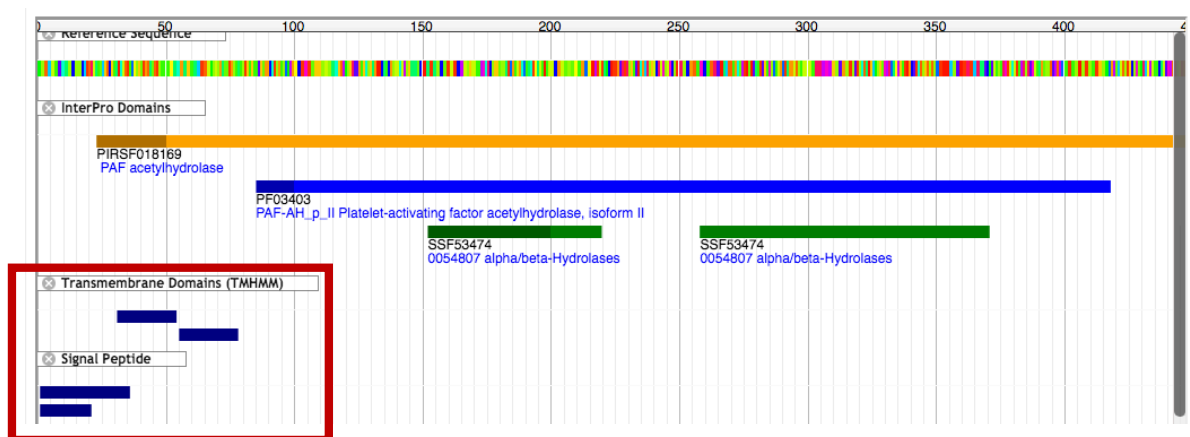


Figure 60 : Prédiction des différents domaines de TbPLA1c selon TriTrypDB.

On observe dans le carré rouge la présence de la prédiction pour le peptide signal et le domaine transmembranaire.

2.1.3.2 Les méta-analyses et le TrypTag

Sur le site TriTrypDB, nous pouvons voir plusieurs localisations prédites pour TbPLA1c. La première localisation intéressante est glycosomale. L'équipe du Dr. Ferguson (Güther et al. 2014), par une technique de SILAC et Spectrométrie de Masse a été en mesure de la détecter (high confidence). Cependant, cela va à l'encontre des données publiées par deux fois par le Dr. Colasante, qui ne la retrouve pas dans le glycosome (Claudia Colasante et al. 2013). Il faut noter que TbPLA1b a été retrouvé dans une analyse des glycosomes de *Trypanosoma brucei brucei* (C Colasante et al. 2006).

Les analyses de [TrypTag](#) nous montrent une autre localisation possible pour cette protéine (Figure 61).

La protéine taguée en N-term montre une localisation à la lumière du noyau cellulaire. En C-term elle montre une localisation dans le RE et le pore nucléaire. La localisation exacte de cette protéine n'a donc pas encore été décrite avec certitude.

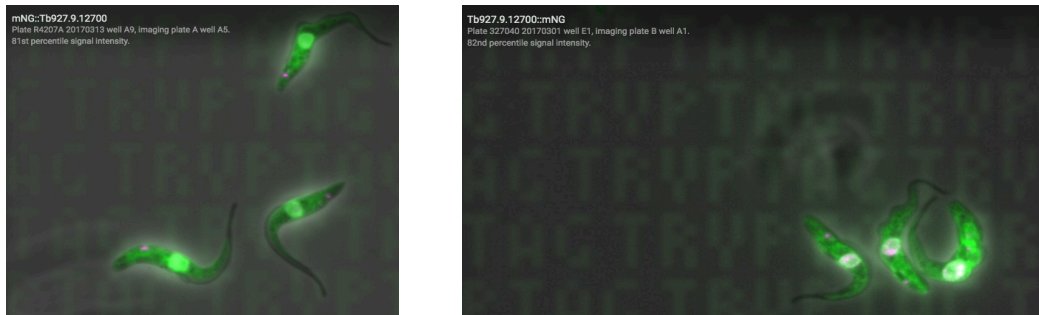


Figure 61 : Localisation de TbPLA1c en N-term et en C-term de la protéine d'après le site TrypTag

2.1.3.3 L'expression le long du cycle cellulaire

Le turnover de cette protéine est constant le long du cycle, comme TbPLA1b ((Tinti et al. 2019)). Cette protéine pourrait donc par exemple occuper une place dans le métabolisme de fond ou dans la structure du parasite et n'est pas modifiée lors de la multiplication du parasite (Figure 62).

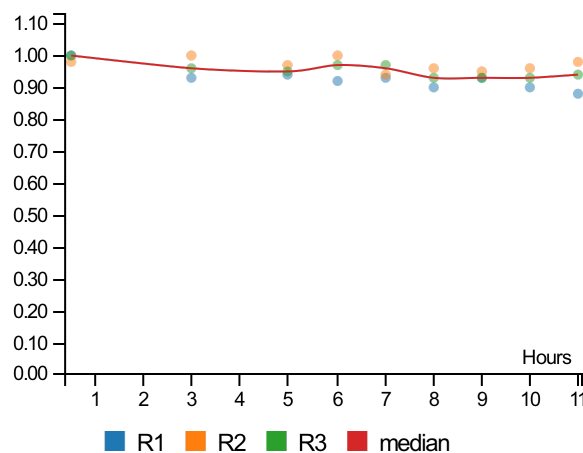


Figure 62 : Evolution de la quantité de TbPLA1c le long du cycle cellulaire selon le Dr. Tinti.

2.1.3.4 TbPLA1c dans la littérature

L'activité PLA2 au sein du trypanosome africain est depuis longtemps discutée voire controversée (Eintracht et al. 1998). Beaucoup de chercheurs pensaient que le parasite en était dépourvu (Ridgley et Ruben 2001) et qu'il compensait avec une activité PLA1

suivie d'une activité lysoPLA. Cependant, cette activité a pu en certaines occasions être démontrée (Eintracht et al. 1998), (María Laura Belaunzarán, Lammel, et de Isola 2011). Le Dr Muhammad proposa dans sa thèse l'étude d'une phospholipase du trypanosome africain dont l'orthologue humain était annoté PLA2. Il décrit TbPLA1c comme une PLA2 (Muhammad 2009). Ensuite le Dr. Nok publia un article sur des alignements entre différents organismes et kinétoplastidés pour cette PLA2 (I. Y. Longdet et al. 2015), puis sa proposition de vaccination grâce à cette enzyme (I. Longdet et al. 2016).

Le Dr. Nok a étudié TbPLA1c du trypanosome africain afin de développer une piste vaccinale. A l'image des PLA2 présentes dans les venins de serpent, il pensait que cette enzyme aurait de bonnes capacités immunogènes. Il a donc utilisé l'ADN de TbPLA1C pour immuniser des souris. Il explique que la présence de motifs CpGs permettrait une immunostimulation globale de l'hôte, produisant une activité trypanocide rapide. Il a en plus ajouté à certains groupes de souris un booste vaccinal de protéine TbPLA1c, améliorant encore la résistance des souris au parasite (I. Longdet et al. 2016).

2.2 Etudes expérimentales

2.2.1 La localisation de la TbPLA1c dans le trypanosome africain

Afin d'élucider la localisation de TbPLA1c dans le *Trypanosoma brucei brucei* nous avons utilisé différentes approches.

- Expression dans le trypanosome d'une version tagguée de TbPLA1c à l'aide du plasmide pLew100 (TbPLA1cTy) dans une lignée n'exprimant plus la protéine native (KOTbPLA1c).
- Stratégie d'endotagging *in situ* afin d'avoir l'expression native de la protéine.

2.2.1.1 Réexpression de TbPLA1cTy dans le trypanosome à l'aide du pLew 100

Cette approche ayant fait ses preuves pour TbPLA1b (partie précédente) nous avons choisi de l'utiliser afin de déterminer la localisation de TbPLA1c. Pour cela nous avons d'abord créé une lignée Knock-Out dans laquelle ont été supprimés les allèles de TbPLA1c. Les détails concernant la création de ce mutant sont présentés plus bas (2.2.5.1). Ensuite nous avons réintroduit une copie de TbPLA1c possédant un tag Ty à l'aide du plasmide pLew100. La même approche d'expression d'une version tagguée a été utilisée dans la souche sauvage Antat 1173. L'anticorps anti-Ty nous permet de détecter la copie introduite par WB, comme le montre la Figure 63.

Malgré l'ajout croissant de tétracycline inductrice, TbPLA1c n'était pas visible, ni en WB, ni en fluorescence après une sélection pourtant effective à la phléomycine. Plusieurs clones de bactéries ont été utilisés et plusieurs transfections ont été réalisées sans résultat. L'anticorps Ty a été vérifié sur une membrane en parallèle et était fonctionnel.

Sur la Figure 63, on observe que l'énolase, marqueur de charge, est tout à fait présente, tandis que l'anticorps anti-Ty ne révèle aucune protéine. Malgré la réexpression, la protéine ne semble pas présente. Une solution pour vérifier la présence de l'allèle réintroduit serait d'extraire l'ADN génomique du mutant d'intérêt et d'essayer d'amplifier par PCR le nouvel allèle comprenant le Ty. Cette approche de localisation n'ayant pas fonctionné nous avons donc décidé d'utiliser la technique d'introduction d'un tag directement au locus du gène ou « endotagging ».

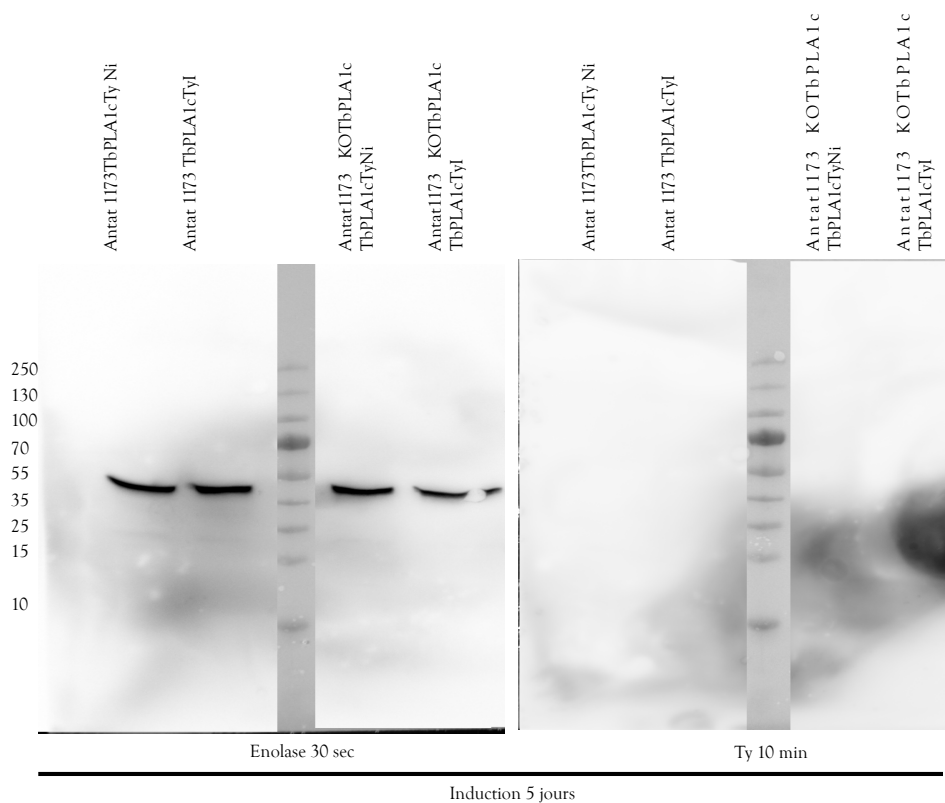


Figure 63 : Western Blot de vérification de la présence de TbPLA1cTy

Les Antat 1173TbPLA1cTy et AntatKOTbPLA1cTbPLA1Ty induites et non induites à la tétracycline pendant 5 jours sont testées afin de vérifier la présence de la TbPLA1cTy. L'anticorps monoclonal anti-Ty a été utilisé pour révéler les protéines tagguées.

2.2.1.2 Endotagging Ty-eYFP-TyTbPLA1c et TbPLA1c10Ty

La stratégie d'endotagger des protéines de parasite a plusieurs avantages. D'abord, cette technique ne nécessite pas l'ajout d'un plasmide entier dans le parasite ce qui favorise la réussite des transfections et rend l'approche moins chronophage. De plus elle permet de tagguer la protéine à son locus et donc de favoriser la régulation endogène de l'expression de la protéine ciblée tout en s'affranchissant des erreurs de polymérisation éventuelles. Pour réaliser cette étude de localisation, nous avons utilisé deux plasmides. Le premier plasmide est celui qui figure dans la publication originale de Sam Dean, le pPotv2 (Dean et al. 2015). Nous avons utilisé ce plasmide pour tagguer la protéine en N-term. La particularité de ce plasmide est qu'il possède un enchainement de Tag Ty-eYFP-Ty. Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 64, le profil d'expression en immunofluorescence montre une localisation de type glycosomale. En effet on peut voir que TyTbPLA1c semble colocaliser avec l'aldolase, marqueur du glycosome.

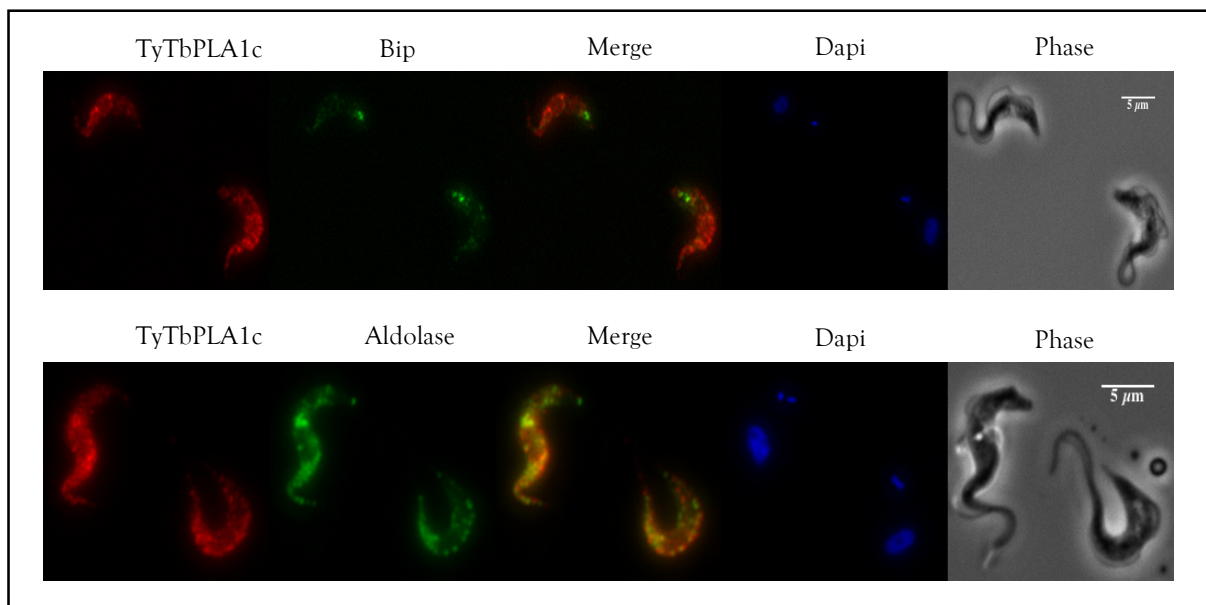


Figure 64 : Endotagging TbPLA1c en N-term grâce au pPotV2.

En rouge TbPLA1c révélée par le Ty-Tag. En vert, Bip, marqueur du Réticulum endoplasmique ou aldolase marqueur de glycosome. En bleu Dapi, marqueur des acides nucléiques.

La possibilité que la protéine soit retenue dans le RE, de par sa concentration autour du noyau cellulaire nous a conduit à effectuer un autre endotagging en C-term de la protéine. En effet, il est tout à fait possible qu'un tag aussi important gêne la localisation, d'autant plus que certains sites sont prédits en N-term pour acheminer la protéine à la

membrane plasmique. Nous avons pu étiqueter TbPLA1c avec un tag composé de 10Ty en C-term dans les souches *Trypanosoma brucei brucei* 427, Antat Smox et Antat 1173 avec l'aide du pPotv7 de Sam Dean. Pour les trois souches, nous avons obtenu le même profil. Nous présenterons donc indifféremment les divers marquages que nous avons effectué pour trouver la localisation de la protéine (Figure 65).

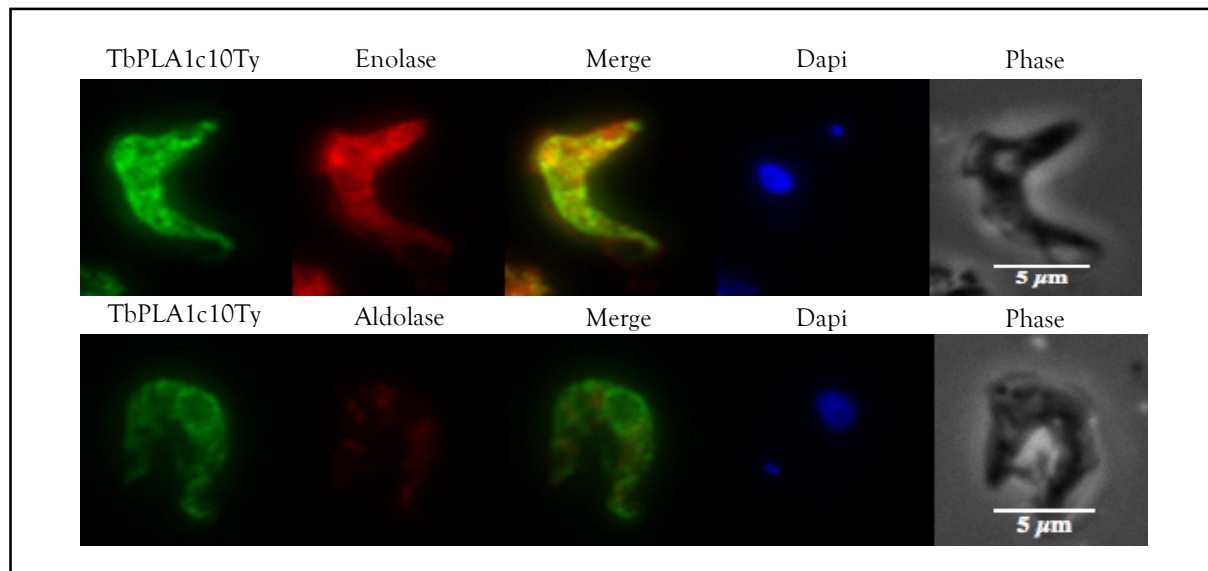


Figure 65 : Endotagging TbPLA1c en C-term grâce au pPotV7.

En vert TbPLA1c révélée par le Ty-Tag. En rouge, émolase, marqueur cytoplasmique ou aldolase marqueur de glycosome. En bleu Dapi, marqueur des acides nucléiques.

Sur la Figure 65, malgré un faible signal, la protéine ne semble pas être localisée dans les glycosomes. Par contre, un signal jaune, de colocalisation semble apparaître avec l'émolase. TbPLA1c pourrait soit être en partie cytoplasmique (par exemple une partie transmembranaire et une partie cytoplasmique) ou les signaux sont trop forts et induisent un biais de colocalisation.

En conséquent, à la suite de différentes expériences, nous n'avons malheureusement pas pu conclure sur la localisation de cette protéine. En effet, la technique de l'endotagging pose un problème concernant la localisation de la protéine, nous ne pouvons être sûrs que cela n'interfère pas sur son adressage et sa structure quaternaire. De plus, notre résultat d'immunofluorescence n'est pas le même que celui du site Tryptag. Une des

solutions serait de pouvoir réexprimer TbPLA1c marquée d'un seul Ty-Tag mais nos tentatives ont pour le moment échoué.

2.2.2 Solubilité de TbPLA1c

Afin de savoir si la protéine est soluble, j'ai effectué un test de lyse hypotonique en utilisant l'énolase comme marqueur de solubilité cytoplasmique et l'aldolase glycosomale sur les Antat1173TbPLA1c10Ty. L'aldolase est une protéine soluble et son maintien dans les glycosomes après cette expérience montre un enrichissement des culots en glycosomes, ces derniers ne sont pas lysés par le tampon de lyse hypotonique.

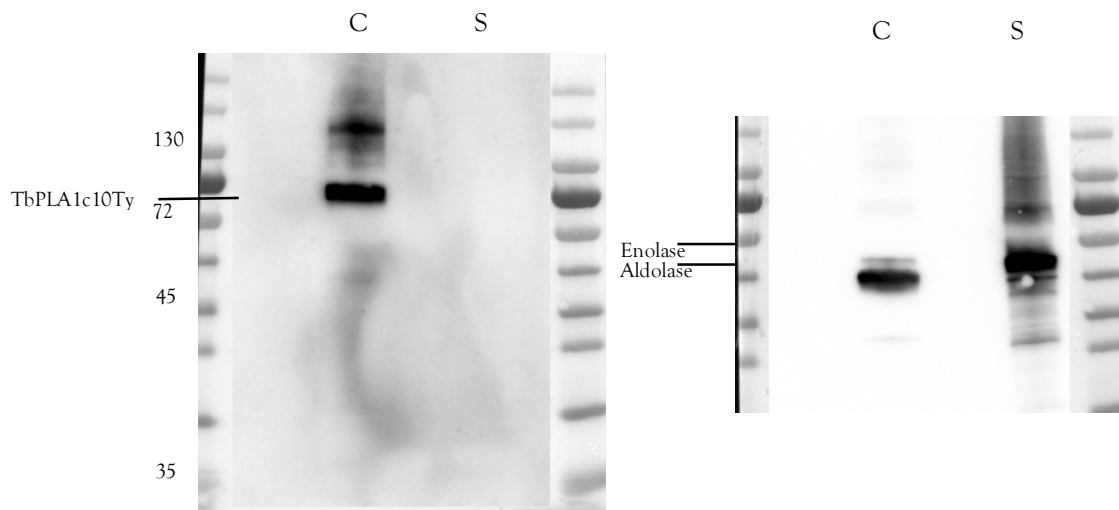


Figure 66 : Expérience de lyse hypotonique avec révélation de la TbPLA1c10Ty à gauche, de l'aldolase et de l'énolase à droite.

A gauche, révélation de Antat1173TbPLA1c10Ty avec l'anticorps anti-Ty, à droite dans le puits C, présence de l'aldolase (41,1 kD) et dans le puits S présence de l'énolase (46,6 kD). C = culot, S= surnageant.

Dans la Figure 66, le changement de taille correspondant à TbPLA1c (49kD) + 10Ty (30kD) n'est pas exact. Nous sommes aux alentours de 70kD au lieu de 80kD et l'apparition de bandes qui n'étaient pas à la bonne taille malgré un anti-Ty très spécifique (130kD), nous ont fait douter de l'efficacité de notre expérience.

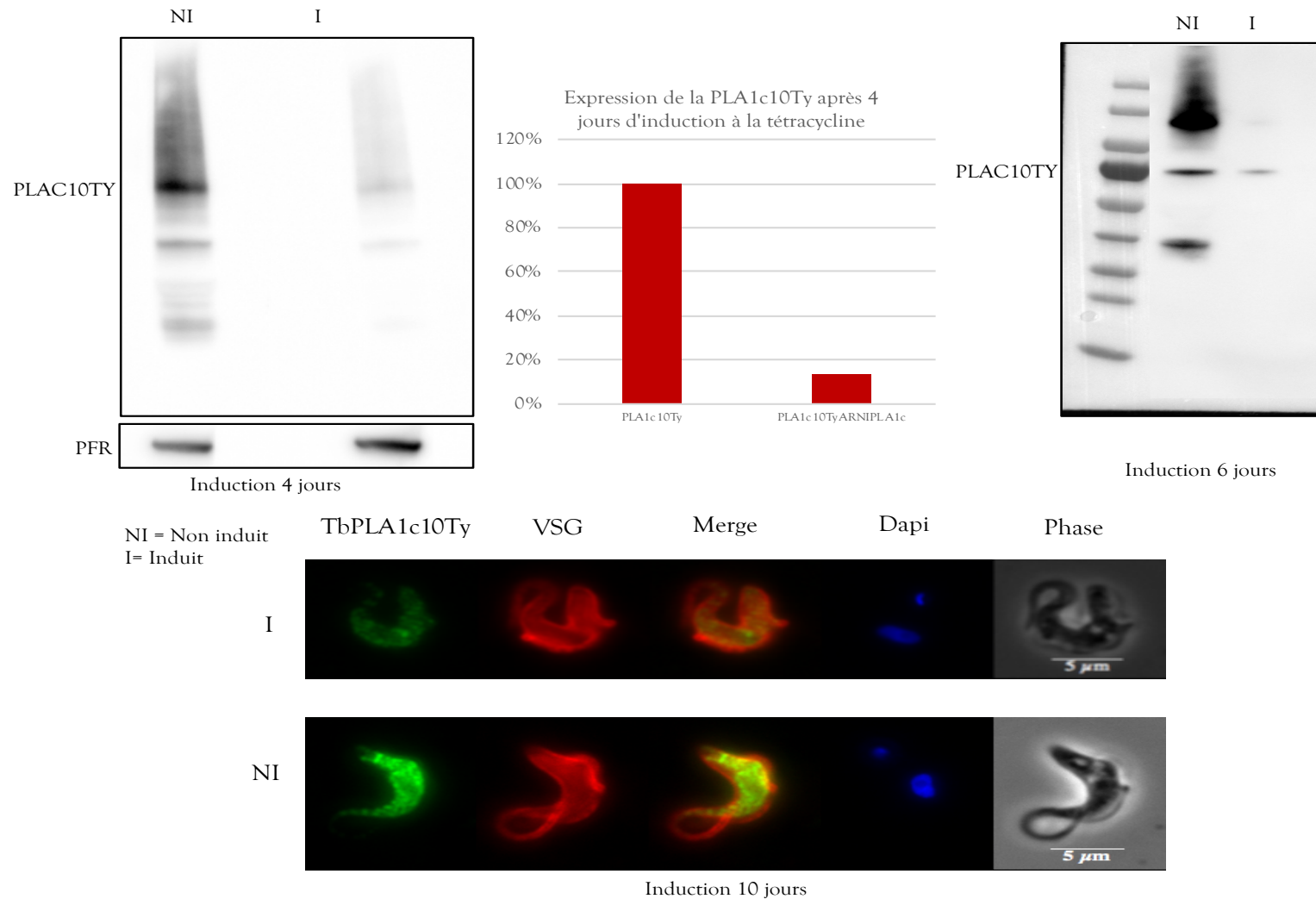


Figure 67 : Évolution de l'expression de la TbPLA1c10Ty en présence de l'ARNiTbPLA1c dans la souche 427

L'analyse quantitative a été réalisée sur le western blot à 4 jours d'induction en normalisant la quantité de protéine par rapport à la PFR (PFR = Marqueur de charge). La TbPLA1c10Ty est révélée en vert par l'anti-Ty et le VSG est révélé en rouge par un anti-VSG sur la figure d'immunofluorescence.

Afin d'observer si la protéine marquée était véritablement TbPLA1c, nous avons utilisé la technique de l'ARN interférence pour supprimer l'expression de TbPLA1c et aussi par conséquent de TbPLA1cTy. Nous avons induit les cellules à la tétracycline, enclenchant ainsi le processus d'interférence pendant 4, 6 et 10 jours et pu observer grâce à un WB, une diminution conséquente de l'expression de la protéine, qui passe de 100% d'expression à 13% sur extraits totaux en seulement 4 jours (Figure 67). La protéine tagguée était donc bien TbPLA1C. Elle se trouverait dans la fraction membranaire ou insoluble du parasite.

2.2.3 Création d'anticorps spécifiques

Afin de localiser TbPLA1c de manière plus précise et en conditions natives, nous avons envisagé d'utiliser des anticorps spécifiques dirigés contre cette enzyme. Pour cela, nous avons tenté de l'exprimer dans des conditions hétérologues en utilisant *E.Coli* BL21.

Après un grand nombre de tentatives pour l'exprimer, en jouant sur les milieux, les souches de bactéries et les températures, nous n'avons pas pu obtenir de protéine soluble. Nous avons changé le plasmide d'expression pGEX pour un PetSUMO, sans plus de succès. Nous avons donc décidé de synthétiser un peptide spécifique de la protéine afin de créer des anticorps que nous pourrions tester (Figure 59).

Ce peptide, à la séquence suivante : GHCDNSASFMRDSSGKE, nous a permis d'immuniser deux lapins. Après multiplication des tests, les anticorps donnent un signal non spécifique et non stable entre les différentes expériences. Beaucoup de bandes apparaissent et nous avons dû nous rendre à l'évidence que ces anticorps ne sont pas utilisables.

Il faut noter que TbPLA1c a été exprimée par le Dr. Khalid Muhammad qui a aussi réussi à la purifier. Ces expériences n'ont pas mené à la publication d'un article scientifique mais peuvent être consultées dans la thèse du Dr Khalid Muhammad (Muhammad 2009). Durant ses expériences, le Dr Muhammad a immunisé deux lapins avec des peptides particuliers de la TbPLA1c et a ainsi pu obtenir des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt. Comme nous pouvons l'observer, le peptide que nous avons choisi n'était pas commun à celui du Dr. Muhammad. Ces trois peptides sont ajoutés à l'alignement de séquence pour les situer dans la protéine (Figure 59).

2.2.4 Expression de TbPLA1c dans Rosetta 2

Par chance, lors de mon séjour à St Andrews, nous avons pu tester une souche de bactérie Rosetta 2 et un milieu d'auto-induction qui nous ont permis d'exprimer la protéine dans la fraction soluble du lysat bactérien (Figure 68). Nous avons pu visualiser la protéine grâce à des anticorps anti-his, apportés par le plasmide petSUMO.

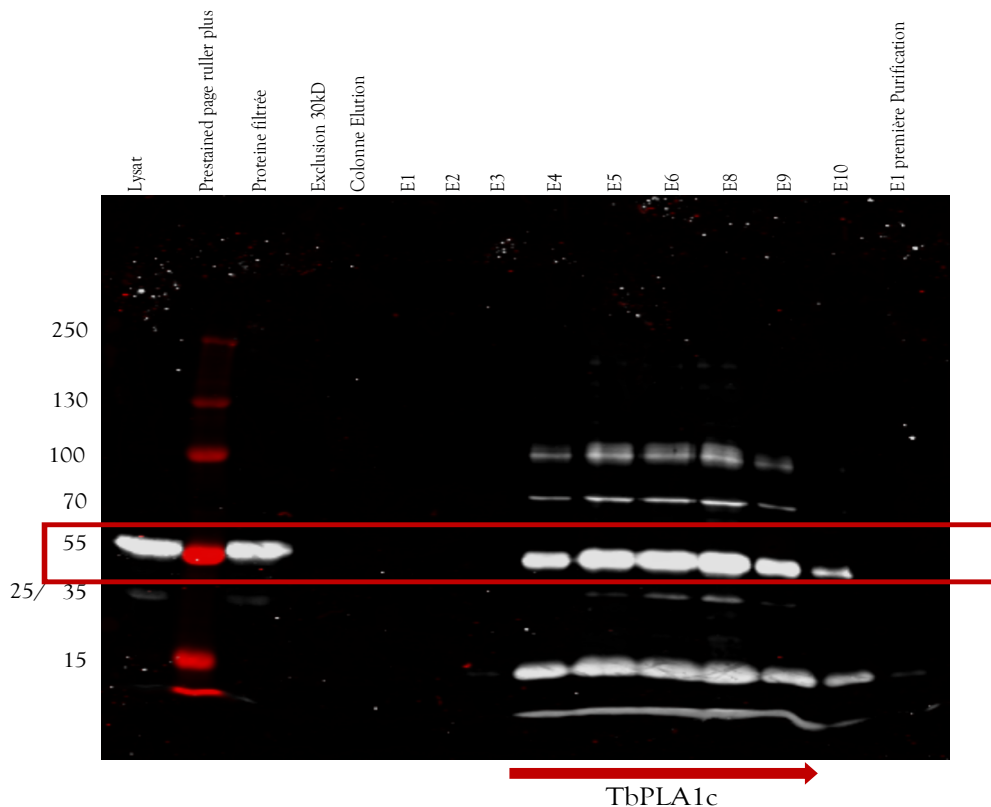


Figure 68 : Purification de la TbPLA1c grâce au plasmide petSumo

Étapes de purification de la TbPLA1c. E = élution (fraction purifiée de la protéine)

Il est à noter ici que le clonage dans le petSUMO a été réalisé à partir de la TbPLA1C tronquée pour la partie N-Term et comprend donc seulement les acides aminés 82 à 447 de la protéine. La partie initiale de la protéine peut possiblement contenir un site transmembranaire gênant l'expression dans les bactéries. De plus, cette première partie n'est pas conservée entre les espèces, elle ne devrait donc pas influencer sur l'activité.

Il faudra donc dans l'avenir tester cette protéine sur différents substrats afin d'en déterminer l'activité principale.

2.2.5 Études fonctionnelles de TbPLA1c

2.2.5.1 Vérification des mutants KOTbPLA1c

Les longs primers utilisés pour l'endotagging comportant des régions homologues aux régions UTR spécifiques des protéines étudiées nous ont permis de générer des KO de TbPLA1c de façon simple. Cette technique nous a permis de réutiliser les primers de localisation et de faire des Knock-Out sans ajout d'un plasmide entier mais seulement du marqueur de résistance au locus par recombinaison homologue.

Il n'y a donc pas eu d'étape de clonage préliminaire mais seulement deux PCR et deux transfections. J'ai pu ainsi obtenir deux clones de KOTbPLA1c dans la souche Antat et un clone dans la souche Antat 1173 (Figure 69).

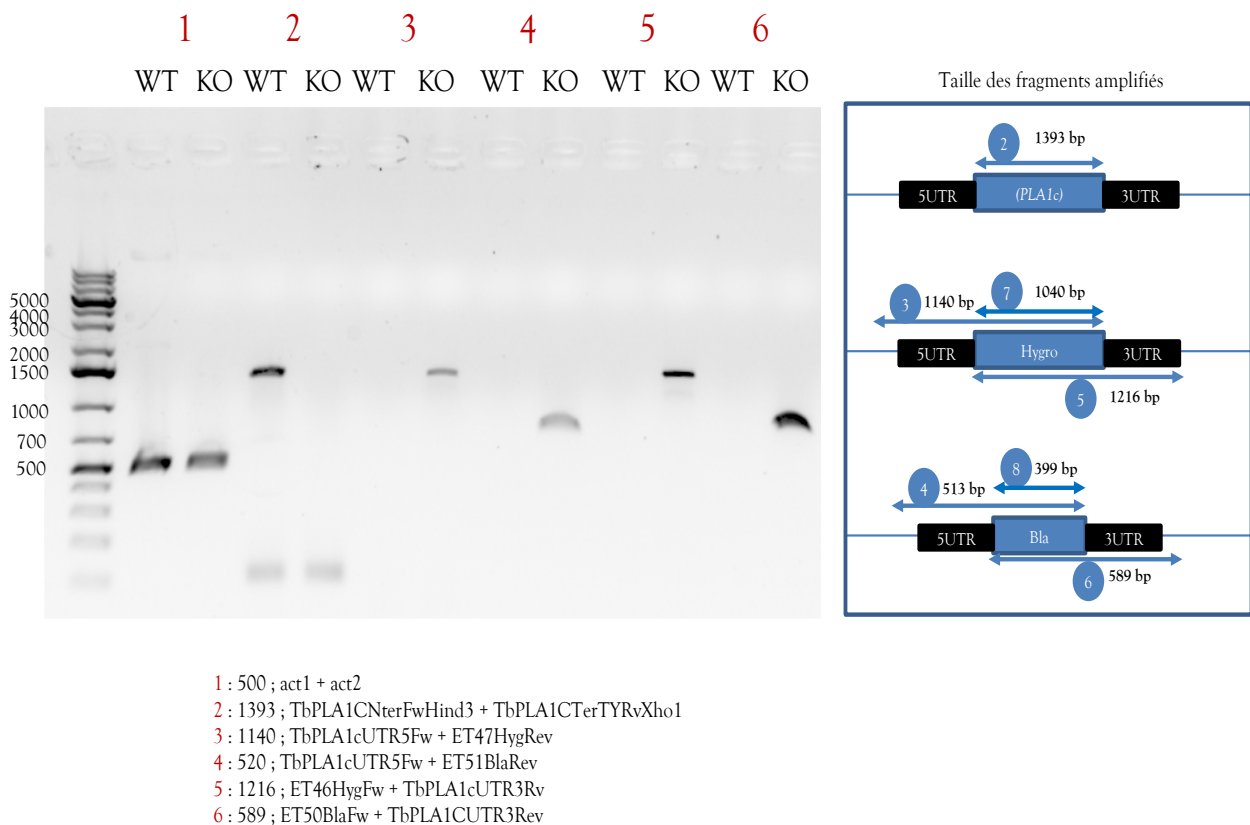


Figure 69 : PCR de vérification du KOTbPLA1c dans Antat1173

2.2.5.2 Croissance des KOTbPLA1c en milieu IMDM

Les mutants n'ont pas de difficulté de croissance en milieu de croissance classique et se divisent en environ 7h, à l'image des cellules sauvages (Figure 70).

Souche	Temps de doublement en heure
Antat	7,02
Antat 1173	6,94
AntatKOTbPLA1c#3	7,31
AntatKOTbPLA1c#4	7,16
Antat1173KOTbPLA1c#1	7,19

Figure 70 : Temps de doublement des KOTbPLA1c par rapport aux cellules Antat sauvages

Les analyses d'activité et les démarches d'étude de fonction ont été faites en parallèle sur tous les mutants que nous avons réalisés durant cette étude. Nous traiterons donc de ces résultats dans une étude comparative de cette thèse.

3 Étude de l'activité phospholipase dans le trypanosome africain.

L'activité PLA1 dans le trypanosome africain est très importante, comme nous le montrent les anciennes publications des années 1980 (Hambrey, Mellors, et Tizard 1981). Malgré la suppression du gène codant pour TbPLA1b, le parasite ne semble pas avoir de problèmes de croissance, ni de virulence (article soumis). Le Dr. Richmond fit le même constat quand il supprima le gène codant pour TbPLA1a (Richmond et Smith 2007a). Ces deux protéines supprimées en parallèle et ayant chacune une activité PLA1, ne montrent pas de phénotype particulier. Parce que le parasite possède plusieurs phospholipases, il est légitime de se demander si certaines d'entre-elles ne sont pas redondantes.

Les phospholipases A1 ne sont pas des enzymes très spécifiques, peut-on imaginer que si le parasite ne peut pas en exprimer une, il compensera par l'expression d'une autre ? Toute la question est donc de savoir combien de phospholipases peuvent se compléter dans le trypanosome africain. ***Quand l'une ou l'autre fait défaut, quelle est l'ampleur de la compensation génétique de ce parasite, comment peut-il s'adapter presque à volonté ?***

Pour répondre à cette question, la stratégie a été de tester l'activité globale PLA1 et PLA2 des parasites, puis mettre en place une série de parasites mutants, délétés pour une ou plusieurs phospholipases, afin d'observer s'il peut y avoir des changements d'activité. Puisque nous possédions déjà le mutant KOTbPLA1b dans la souche *Trypanosoma brucei brucei* 427, la première série d'expériences, a été de tester des ARN interférences (pLew 100) des autres gènes que nous avons sélectionnés dans ce KOTbPLA1b afin d'en observer le comportement parasitaire (Figure 71). Il est à noter ici que le gène que nous avons appelé TbPLA1d (Tb427.08.7440), correspond à la PLA1 étudiée par le groupe de recherche du Dr. Belaunzarán au Brésil. Elle a en effet été décrite dans *Trypanosoma cruzi* (María Laura Belaunzarán et al. 2013).et dans *Leishmania braziliensis* (Bott et al. 2020) Puisqu'elle a été annotée comme PLA1, nous avons trouvé judicieux de l'inclure aux tests de redondance de l'activité PLA1.

TbbLa (Tb427.03.3870) est une enzyme à activité putative lipase que nous avons seulement réussi à endotagger. Elle possède plusieurs domaines putatifs transmembranaires et semble se localiser sous le VSG, cependant aujourd'hui, rien n'est confirmé.

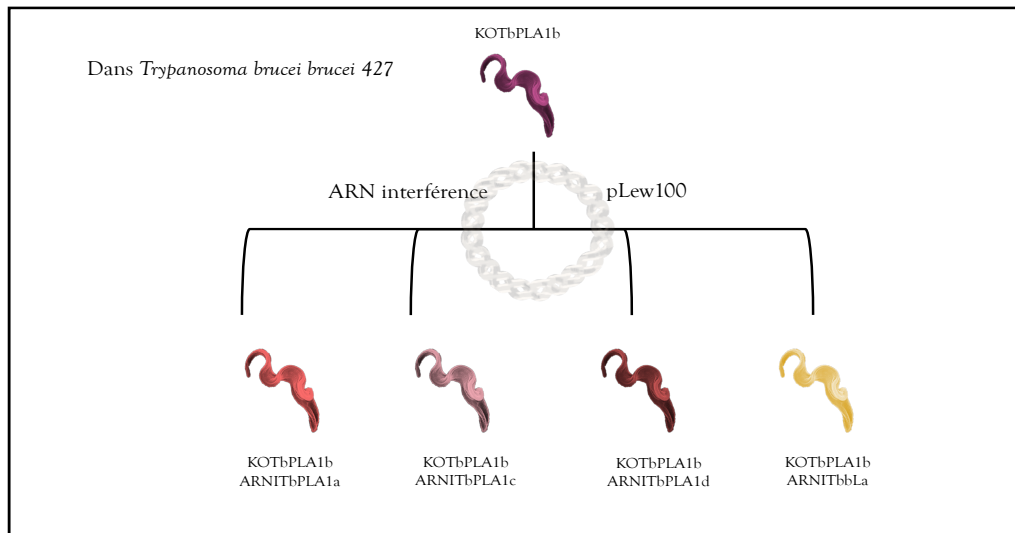


Figure 71 : Stratégie d'étude des activités phospholipases des mutants à partir du KOTbPLA1b.

3.1 Etude de la croissance des différents mutants KOTbPLA1b

Le Pr. Smith explique dans son article que la phospholipase (TbPLA1a) qu'il a décrite est responsable de 81% de l'activité PLA1 (GPCho) dans le trypanosome africain de la forme procyclique (Richmond et Smith 2007a). Nous pouvons donc imaginer que si nous enlevons simultanément TbPLA1a et TbPLA1b nous supprimerons la totalité de l'activité PLA1 et que cela aura des répercussions sur la croissance parasitaire. Nous avons appliqué ce raisonnement à tous les candidats étudiés pendant ma thèse. Ainsi nous avons créé des lignées dans lesquelles il est possible d'inhiber l'expression de chacun de nos candidats par ARN interférence dans un fond génétique correspondant à la lignée KOTbPLA1b (Figure 71). Dans cette analyse nous avons postulé que la quantité en lipides dans le milieu de culture pouvait être un paramètre important influençant la croissance des parasites. Ces lipides étant apportés par le sérum de veau fœtal, nous avons choisi de tester des conditions de milieu classique (10% SVF) et pauvre en lipides (3% SVF). L'étude comparative de la croissance de nos lignées dans ces conditions de culture est présentée dans la Figure 72. Comme nous pouvons l'observer, il n'y a pas de différence de croissance entre les différents mutants, que ce soit pour ceux qui sont induits, comme ceux qui sont non induits à la tétracycline.

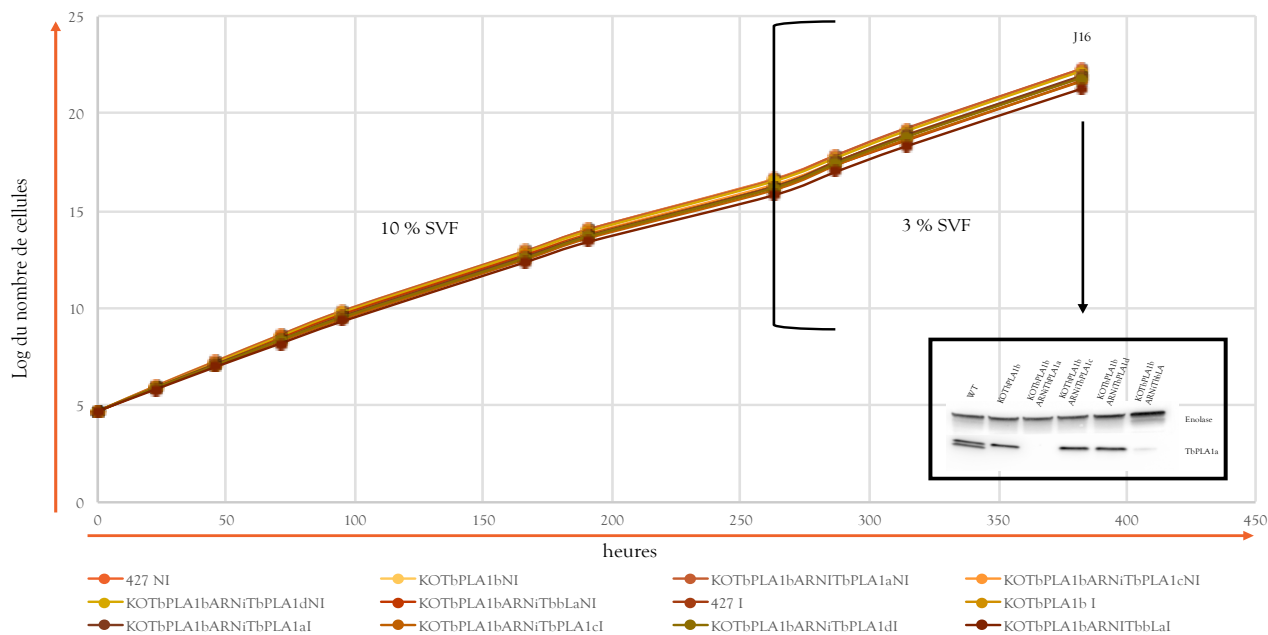


Figure 72 : Courbe de croissance en conditions normales et déprivées en sérum des KOTbPLA1b induits et non induits pour l'expression d'ARN interférences sur d'autres candidats à activité PLA1 putative.

Un Western Blot a été effectué à J16 de la courbe de croissance pour vérifier l'absence de TbPLA1a pour lequel nous possédons un anticorps.

Les résultats obtenus posent plusieurs questions :

- *L'efficacité des ARNi que nous avons réalisé est-elle avérée ?* Bien que je ne puisse être totalement certaine de l'activité de tels ARNi dans ce contexte, ils ont été vérifiés, pour la plupart, dans les constructions d'endotagging, tel que montré dans la partie traitant de TbPLA1c. En effet, on observe une nette diminution de la quantité de protéine en présence de ces ARNi. De plus, un WB associé à la Figure 72 m'a permis de vérifier l'activité de la tétracycline durant cette expérience précisément, car elle induit bien la diminution de la quantité de TbPLA1a dans le KOPLA1b (voir 3^{ème} puits du WB de la Figure 72).
- *L'activité PLA1 est-elle réellement affectée par la disparition de deux gènes à potentielle activité PLA1 ou la redondance est telle que, cette activité perdue par l'expression d'autres gènes ? L'activité PLA1 globale est-elle nécessaire à la croissance du parasite ou n'est-elle importante, comme certains auteurs l'ont laissé supposer, que dans le cas d'une réelle infection, au contact direct de l'hôte ?*

Pour répondre à ces différentes questions, il nous a fallu d'abord déterminer le potentiel d'activité PLA1 que chacun de ces mutants possèdent. *Voit-on véritablement une baisse*

d'activité des mutants ou les gènes sélectionnés ne sont pas les plus intéressants pour ce contexte ?

3.2 Activité PLA1 et PLA2 des mutants 427 KOTbPLA1b

Au laboratoire nous disposons de deux kits d'activité PLA1 et PLA2 que nous pouvons utiliser dans le but de déterminer si une enzyme possède une telle activité.

En plus d'être utilisés pour l'activité d'une phospholipase purifiée, ces kits peuvent être utilisés sur des cellules entières. C'est pourquoi, avec des extraits de parasites lysés, nous avons pu approcher le type d'activité que renferme chacun des mutants.

A J16 de la courbe de croissance parasitaire (Figure 72), nous avons effectué en plus du WB de validation, une expérience d'activité. Pour cela nous avons amplifié les clones induits, puisque selon toute vraisemblance, les clones non induits devraient se comporter comme des KOTbPLA1b. 10⁷ cellules ont été testées en triplicat technique avec les kits PLA1 et PLA2 (Figure 73).

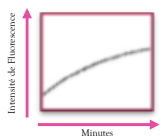
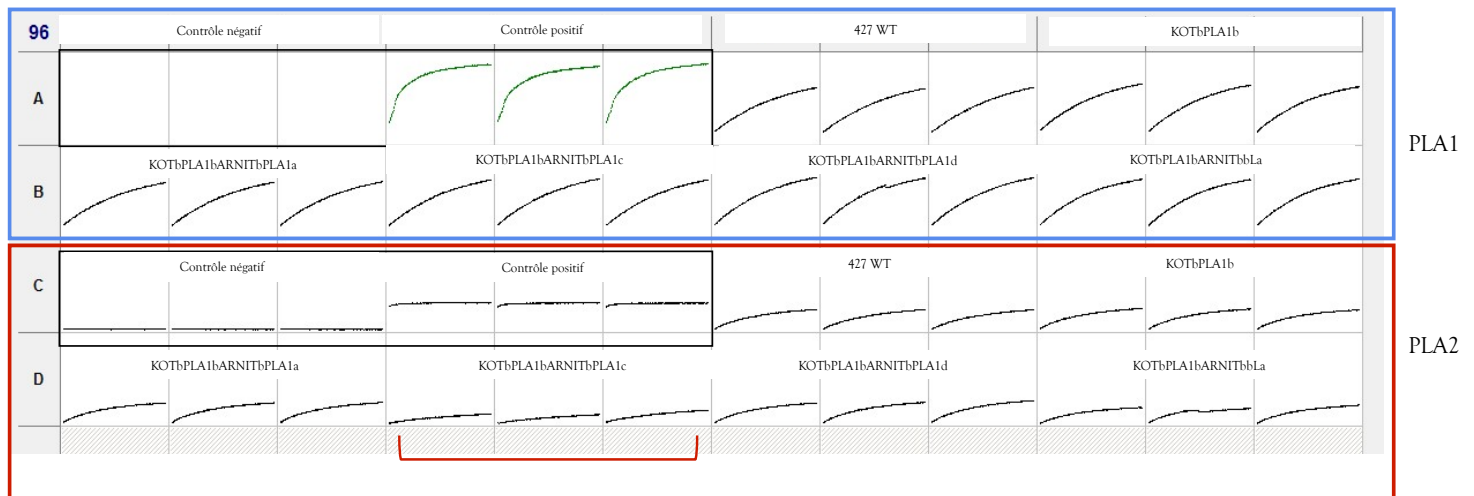


Figure 73 : Activité PLA1 et PLA2 des extraits parasitaires du KOTbPLA1b et de ses lignées ARNI induites à 16 jours.

Dans le rectangle bleu est testée l'activité PLA1, dans le rouge la PLA2. Le marqueur rouge lors du test de l'activité PLA2 du mutant KOTbPLA1bARNiNbPLA1c montre une activité PLA2 diminuée pour ce mutant.

3.2.1 Activité PLA1

Comme nous pouvons l'observer sur la Figure 73, l'activité PLA1 globale semble inchangée peu importe le mutant étudié. L'activité est conséquente mais équivalente entre un trypanosome sauvage et un trypanosome amoindri d'un ou même deux gènes à activité PLA1 putative. Cependant, une limite importante existe pour ce test, qui ne comporte qu'un seul type de micelle. Si les phospholipases A1 du parasite sont plus spécifiques que l'hypothèse que nous avons faite au départ qui stipule que ces protéines ne sont pas des enzymes à l'activité spécifique, alors elles ne pourraient peut-être pas lyser cette micelle faite uniquement de PE(18). *Ce peut-il que le candidat qui lyse le substrat du kit, indifféremment des mutations choisies pour nos parasites, soit responsable de la seule activité que l'on peut détecter ?*

Cependant, nous devons noter que TbPLA1b produite dans *E.Coli* possède une activité d'hydrolyse pour le substrat de ce kit (Article soumis). Or, TbPLA1b est présente dans les puits A7, A8 et A9, puisqu'ils contiennent les parasites sauvages de la souche 427 et l'activité PLA1 n'est pas deux fois supérieure. *Comment expliquer que TbPLA1b lyse le substrat du kit et qu'en son absence la quantité de lysophospholipide produite soit identique ?*

L'explication la plus plausible selon nous, serait que le candidat responsable de cette activité PLA1 que l'on détecte avec le kit, n'est pas un des candidats que nous avons sélectionnés et qu'il prend le relais dans le parasite quand la TbPLA1b n'est pas exprimée, afin de maintenir un pool similaire d'activité.

Des analyses de spectrométrie de masse pourraient nous aiguiller sur les protéines qui pourraient être surexprimées dans le parasite KOTbPLA1b, cependant il faut garder en tête que ce n'est pas la quantité d'une enzyme qui fait son efficacité et si cette enzyme est beaucoup plus efficace que TbPLA1b pour lyser du PE, alors nous ne verrons peut-être pas d'augmentation significative dans les données.

3.2.2 Activité PLA2

Il est important de noter que si l'on compare la constance de l'activité PLA1 dans tous les mutants, on remarque que dans le mutant KOTbPLA1bARNiTbPLA1c, l'activité PLA2 y semble plus basse comparée aux autres mutants. Ce résultat nous a poussé à l'analyse de nouveaux mutants afin de déterminer si cette diminution d'activité est réelle. Si

l'observation est reproductible, cela validera une activité PLA2 pour TbPLA1c, mais aussi les constructions ARNiTbPLA1c.

Afin de déterminer si la TbPLA1c possède vraiment une activité PLA2 et valider l'absence d'activité pour les autres candidats, nous avons entrepris de tester des parasites KO pour les différents candidats avec les mêmes kits enzymatiques.

3.3 Analyse des KO des gènes candidats

Afin de valider les expériences précédentes, il a été nécessaire d'obtenir des parasites KO pour les différents gènes étudiés. Nous n'avons pas réussi à obtenir de KOTbPLA1d. Plusieurs techniques ont été utilisées, notamment l'expression conditionnelle (pLew 100) d'un allèle de gène dans un 427 délété pour un allèle de TbPLA1d sans résultat. Nous avons donc poursuivi les études sur les 3 autres candidats (Figure 74).

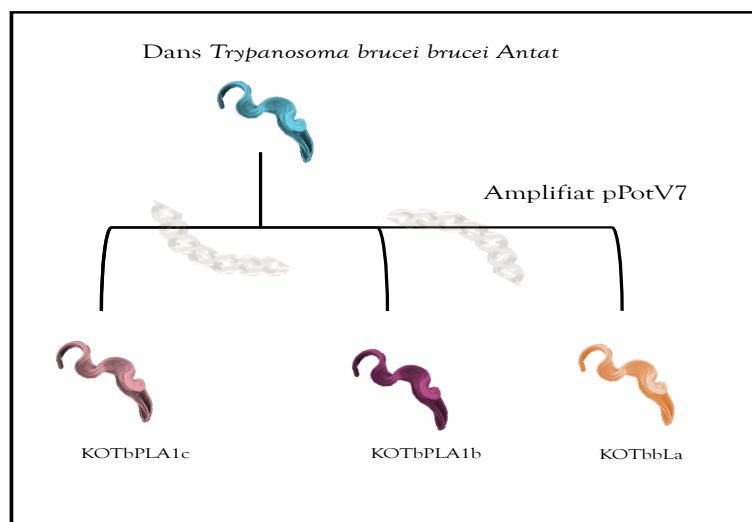


Figure 74 : Obtention des KO d'intérêt grâce à l'utilisation du pPotV7.

3.3.1 Etude de la croissance des différents mutants en milieu 10% SVF

Pour observer l'impact de la délétion de ces gènes d'intérêt, nous avons réalisé une courbe de croissance en milieu conventionnel IMDM supplémenté de 10% de SVF. Nous avons profité de cette expérience pour mesurer l'impact des antibiotiques sur la croissance parasitaire. En effet, il n'est pas rare d'observer une croissance ralentie des parasites dans des milieux supplémentés en antibiotique.

Souvent, deux clones validés pour leur délétion, par du séquençage par exemple, ne se multiplient pas de la même façon en présence d'antibiotique. Nous avons observé que la différence de temps de multiplication entre les clones disparaissait quand on suspendait l'ajout d'antibiotique de sélection. Cependant, il nous appartient de discriminer la part que prend l'ajout d'antibiotique dans la multiplication du parasite versus l'absence du gène d'intérêt.

Afin de voir cette différence interindividuelle (analogue à celle des humains) des parasites, nous avons effectué deux courbes de croissance pour vérifier que le délai de croissance est imputable à la délétion de gène (Figure 75) et non à l'activité des antibiotiques (Figure 76).

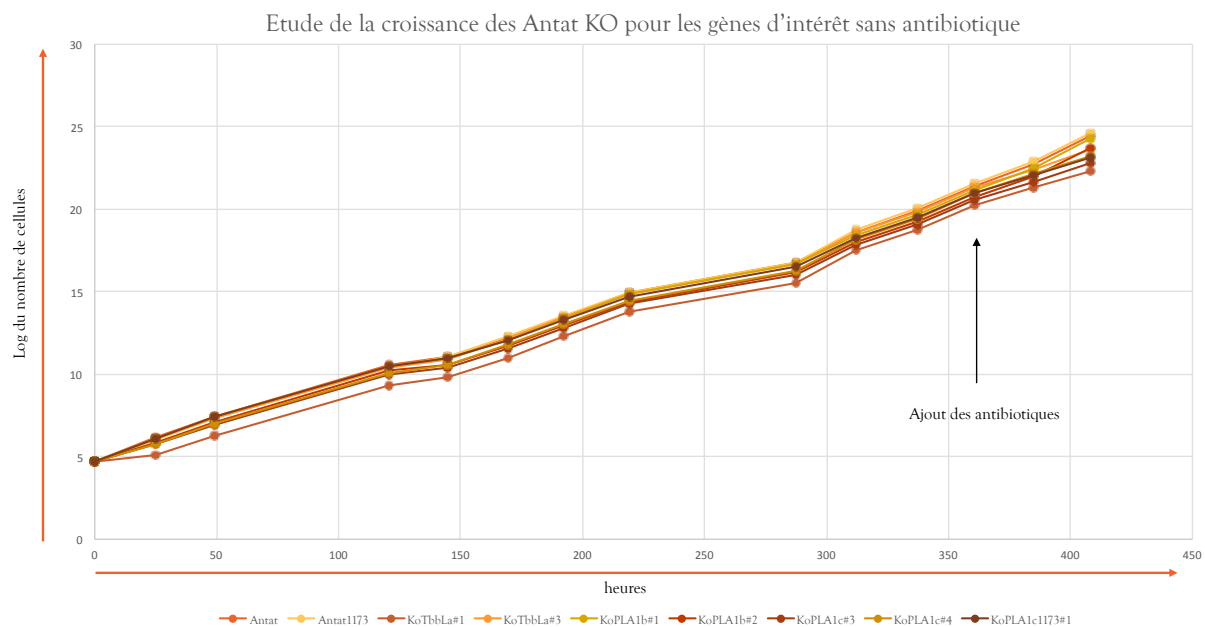


Figure 75 : Courbe de croissance sans antibiotique des Antat KO pour les gènes d'intérêt.

Dans cette première courbe (Figure 75), on peut observer que le mutant KOTbbLa#1 met plus de temps lors du premier point à pousser mais que la tendance est ensuite la même et la vitesse de croissance identique aux autres. Le résultat du calcul de la pente entre le point 3 et 4 de cette courbe est le même, indiquant une multiplication identique malgré un retard de départ. On conclut de cette courbe qu'il n'y a pas de différence de croissance entre les différents mutants dans ces conditions de culture.

Si on observe la deuxième courbe (Figure 76), qui a été réalisée les mêmes jours dans les mêmes conditions et avec les mêmes parasites de départ, on observe des différences pour les mutants ayant poussés en présence d'antibiotique.

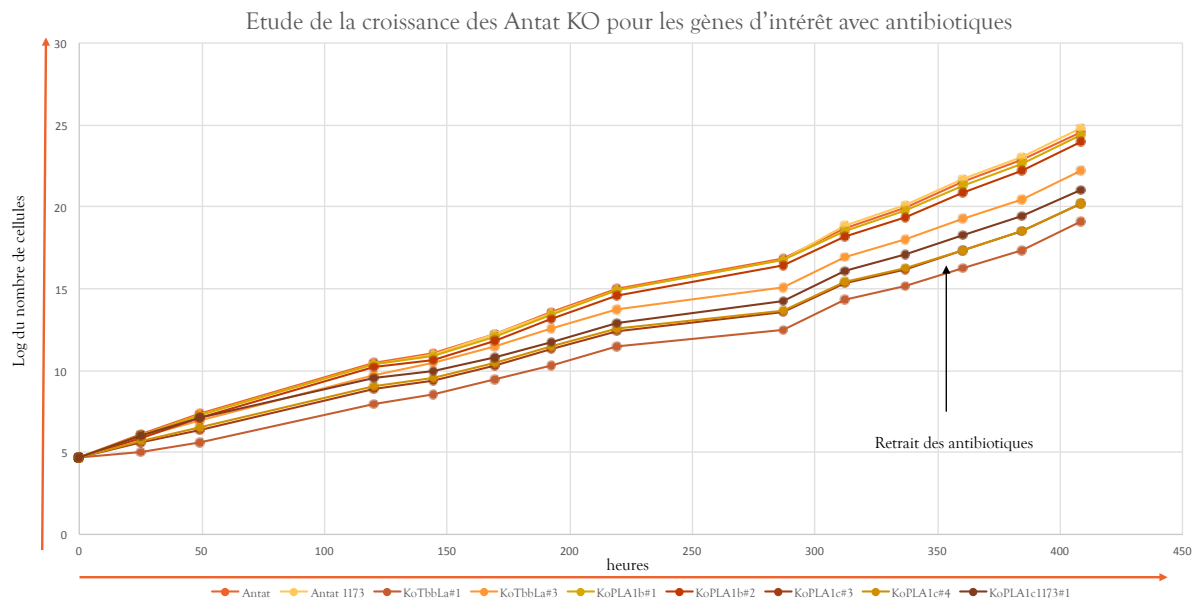


Figure 76 : Courbe de croissance avec antibiotique des Antat KO pour les gènes d'intérêt.

La conclusion de ces deux figures est la nécessité d'arrêter de cultiver les parasites dans des milieux comportant des antibiotiques car cela peut affecter leur métabolisme et leur croissance. Les données issues d'une culture en présence d'antibiotique pourront être faussées, pour les analyses descriptives d'une courbe de croissance mais pour toutes autres analyses incluant la protéomique et la lipidomique par exemple. De plus, ces données ne sont même pas relatives, c'est à dire que selon le mutant que l'on choisit, s'il est plus ou moins sensible à l'antibiotique présent, nous n'aurons pas les mêmes résultats. Une bonne approche serait peut-être de faire une expérience de protéomique et de métabolomique sur des parasites cultivés dans les antibiotiques et de lister un pool de modifications imputables à l'antibiotique. On pourrait donc à chaque analyse se référer à ce biais, pour l'éliminer au mieux.

Pour conclure sur la croissance des différents mutants, il semble qu'il n'y a pas de différence de croissance dans ces conditions. La perte d'un gène de PLA putative, ne semble pas affecter la survie ni la croissance du parasite. Cependant toutes ces études sont faites dans des conditions où le parasite n'est pas sollicité par l'hôte ni confronté à des difficultés de mise à disposition des ressources. *Qu'en est-il si le parasite évolue dans des concentrations de sérum différentes ?*

3.3.2 Etude de la croissance dans des milieux aux concentrations différentes en SVF

Les parasites mis en culture à 10 % de sérum ne semblent pas éprouver de difficulté de croissance. *Or, si les phospholipases ne sont pas essentielles à la survie dans les milieux riches en lipides, peut-être le sont-elles quand on prive le parasite ? De même, si elles servent à détoxifier le milieu, peut-être observerons nous un retard de croissance en trop grande quantité de sérum, seule source exogène de lipide pour les parasites en culture ?*

Pour répondre à cette question, nous avons effectué des courbes de croissance des différents parasites en concentrations différentes de sérum. Une échelle partant de 1,5% à 40% a été testée. Dans cette expérience, en plus de tester les différents mutants, nous avons aussi voulu tester différentes souches de parasite. En effet, le travail sur la souche de trypanosomes 427 n'est pas conseillé si l'on souhaite faire des expériences *in vivo* sur les souris. Cette souche induit une symptomatologie aiguë, trop rapidement mortelle. Les PLA étant des facteurs de virulences, possiblement impliqués dans la relation hôte-pathogène, il nous semblait important de pouvoir tester les mutants *in vivo*. C'est pourquoi une grande partie de mon travail de thèse a été réalisé dans la souche Antat1.1 (Paris) connue pour développer une affection chronique. Malgré le fait que nous possédions déjà le KOTbPLA1b dans la souche 427, il nous a paru nécessaire de le reproduire dans les Antat. Les courbes de croissance ont été réalisées avec les mêmes parasites qui ont été centrifugés et lavés afin de commencer la croissance dans un milieu à la concentration indiquée en sérum en s'affranchissant du milieu de culture précédent (IMDM 10% sérum).

Lorsque nous observons la croissance des parasites entre 20 et 40 % de sérum (Figure 77), ils ne semblent pas être affectés. Au contraire, une légère augmentation globale de la croissance survient. A 40%, l'observation microscopique montre des parasites de taille plus importante et se déplaçant un peu plus lentement. Cependant cela peut être dû à la viscosité du sérum.

A la fin de cette expérience nous avons mis les parasites dans 100% de sérum et observé leur mort progressive, dès le lendemain.

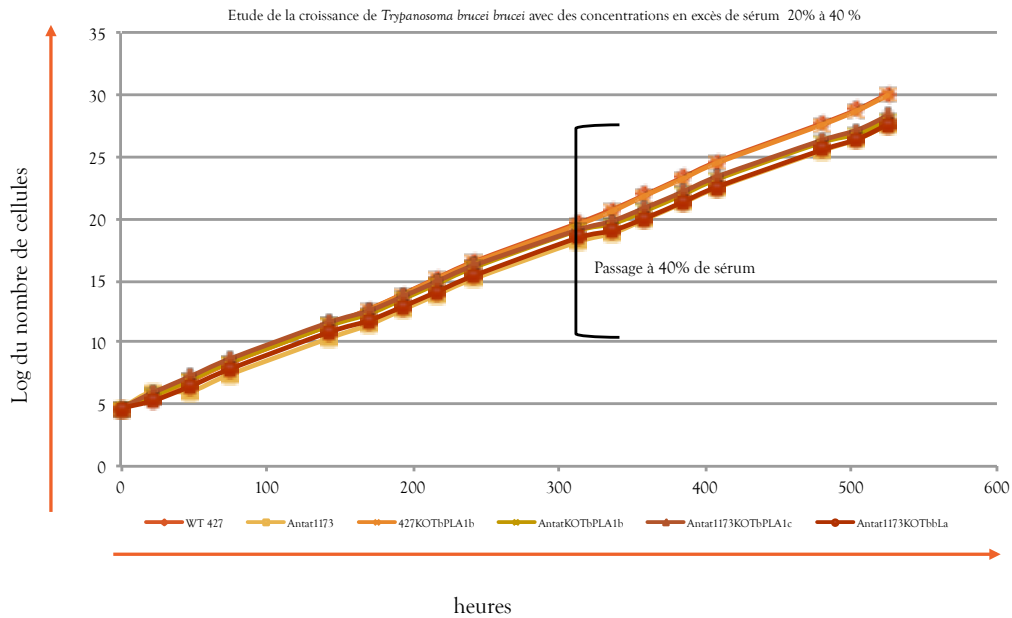


Figure 77 : Courbe de croissance de *Trypanosoma brucei brucei* en excès de sérum.

Si l'on observe les courbes correspondant à des parasites cultivés avec une très faible concentration en sérum (Figure 78), nous pouvons constater que les parasites semblent tout de même s'adapter plutôt bien à ces conditions. Malgré un ralentissement évident qui nous a obligé à centrifuger les parasites tous les jours afin de les remettre dans la quantité décrite de sérum pour avoir une égalité de composition du milieu de croissance, les parasites survivent.

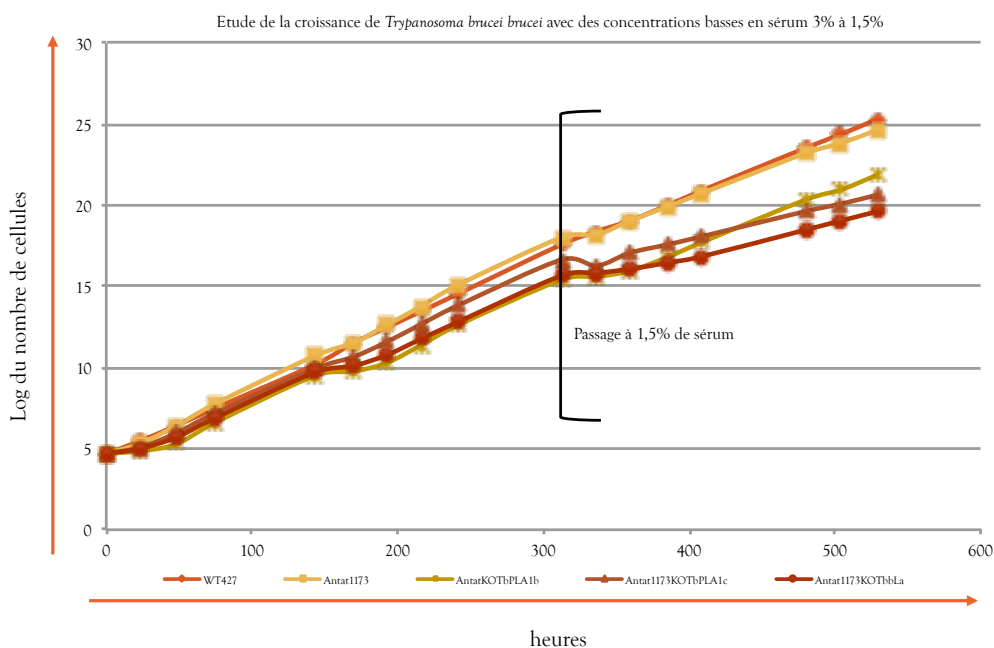


Figure 78 : Courbe de croissance de *Trypanosoma brucei brucei* en défaut de sérum.

A la fin de l'expérience, nous avons mis les parasites dans 0,75% de sérum. Certains poussaient encore un peu le lendemain, notamment la souche WT 427 mais la plupart était sur le déclin très rapidement, jusqu'à mourir.

Donc, dans ces conditions de culture, les différentes lignées présentent un retard évident de croissance mais qui pourrait simplement être dû au stress, forçant les parasites à mettre en jeu des processus adaptatifs :

- Si l'environnement est riche en lipides la production de phospholipases permettrait de détoxifier son environnement,
- Si l'environnement est pauvre en lipides, la production de phospholipases permettrait d'effectuer un turn-over sur les lipides existant ou d'augmenter les chances d'acquérir davantage de lipides.

Des expériences d'activité ont donc été réalisées afin de répondre aux questions qui découlent de cette hypothèse. *Observerons-nous une activité différente selon le milieu de culture ?*

3.3.3 Activité PLA1 des différents mutants

Afin de tester l'activité PLA1 des différents mutants dans des conditions de croissance différentes, nous avons cultivé les parasites dans 3%, 5%, 7,5%, 10% et 20% de sérum pendant 2 jours et demi. L'expérience d'activité a ensuite été réalisée en triplicat en ajoutant 10^7 cellules lysées au substrat fluorescent. L'expérience n'a pas été normalisée sur la quantité de protéines mais sur la quantité de cellules (Figure 79).

Nous avons remarqué après plusieurs expériences que la quantité de protéines que l'on retrouve dans les parasites de la souche Antat est inférieure pour une même quantité de cellules à la quantité que l'on retrouve dans la souche 427. Ceci pourrait expliquer en partie la différence d'activité que l'on retrouve entre la souche Antat et la souche 427. Visuellement les parasites 427 sont plus gros au microscope que les parasites Antat. Normaliser par la quantité de cellules n'est donc peut-être pas ici la méthode la plus adaptée. Cependant cette expérience nous apporte quelques réponses intéressantes (Figure 79).

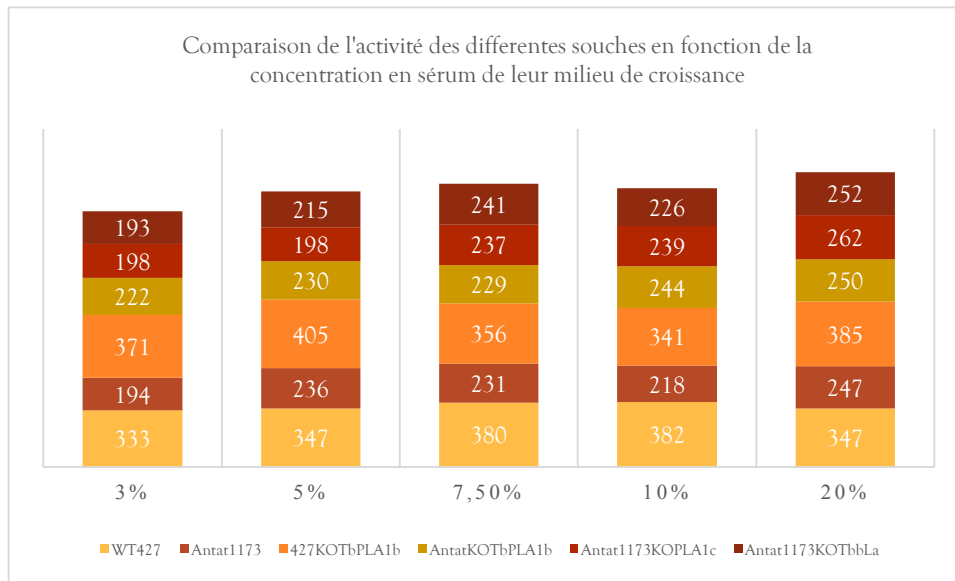


Figure 79 : Comparaison de l'activité PLA1 entre les différents mutants cultivés dans des concentrations différentes en sérum.

L'analyse de ces résultats d'activité nous montre qu'au sein de la souche Antat, l'activité PLA1 est plus élevée si les parasites ont poussé dans un milieu contenant une plus grande quantité de sérum. Donc l'activité PLA1 est légèrement augmentée en présence d'un milieu plus riche en lipides. Concernant la souche 427, sur la base d'une seule expérience en triplicat technique, on ne peut conclure à une augmentation en fonction de la quantité de lipides. Cependant nous pensons que dans ces circonstances l'expression des PLA1 est trop stable pour que nous puissions voir quelque chose. Il semblerait que les mutants que nous avons testés ne soient pas exhaustifs en terme d'activité PLA1 et que d'autres candidats agissent pour maintenir cette activité. Ces résultats sont encourageants car ils montrent que le parasite peut s'adapter pour avoir toujours une quantité constante de PLA1. L'activité est présente quelle que soit le gène manquant et doit donc avoir une part importante dans la survie du parasite.

3.3.4 Activité PLA2 des différents mutants

De la même manière que nous l'avons fait pour l'activité PLA1, nous avons voulu apprécier le comportement global de l'activité PLA2 dans nos lignées cultivées avec des concentrations variables en sérum.

Nous avons d'abord réalisé un premier test à l'aide du kit Enzcheck PLA2® de Termofisher sur les différents mutants pour explorer cette activité avec pour chaque test 10^7 cellules utilisées.

Comme le montre la Figure 80, nous avons pu détecter cette activité dans la plupart des lignées à l'exception de celles n'exprimant plus TbPLA1c ainsi que de la souche Antat WT.

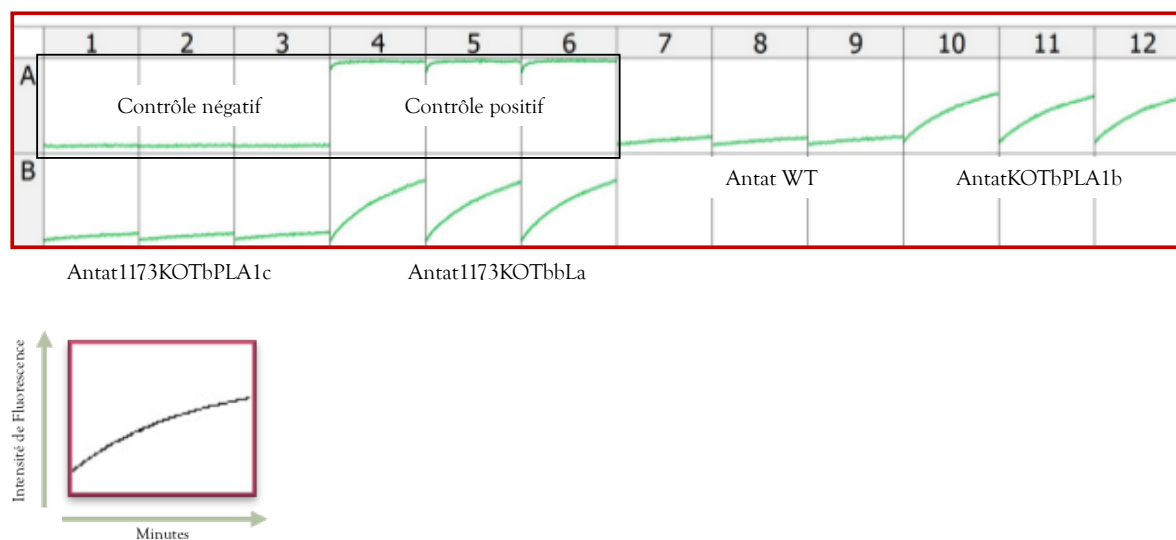


Figure 80 : Activité PLA2 dans les Antat et les différents KO des gènes d'intérêt.

L'hypothèse qui nous a apparu la plus plausible concernant les mutants KOTbPLA1c est que TbPLA1c aurait une activité PLA2 plutôt que PLA1 confirmant certains travaux déjà réalisé auparavant mais non publiés (Muhammad 2009).

Les résultats concernant la souche Antat WT prêtent plus à réflexion :

- En l'absence de mutation, l'Antat n'a pas besoin d'activité PLA2 pour survivre. Cette activité arriverait pour compenser le manque des PLA1 que sont supposées être TbPLA1b et TbbLa. Donc cette enzyme serait l'enzyme compensatrice.
- Une explication plus simple serait que les parasites n'étaient tout simplement pas au même stade de croissance.

Les cellules étaient poussées comme suit au comptage :

AntatWT	AntatKOTbPLA1b	Antat1173KOTbPLA1c	Antat1173KOTbLa
$1,74 \cdot 10^6 / \text{mL}$	$1,83 \cdot 10^6 / \text{mL}$	$1,81 \cdot 10^6 / \text{mL}$	$1,71 \cdot 10^6 / \text{mL}$

Figure 81 : Comptage des cellules avant l'expérience qui donna lieu à la figure 80

La Figure 81, montre que les cellules étaient toutes à la même concentration dans notre expérience. La deuxième explication ne peut donc pas être vérifiée.

Afin de répéter cette première expérience, nous avons utilisé les mêmes cellules et les avons amplifiées. Cependant, le lendemain, les lignées AntatKOTbPLA1b et AntatKOTbLa ne se sont pas multipliées, indiquant que la veille, elles étaient en phase stationnaire, presque mortes. Cette information est importante pour comprendre ce qui diffère entre les cellules qui possèdent une activité PLA2 et celles qui n'en possèdent pas.

Puisque notre problème découlait du manque d'activité des Antat WT et des KOTbPLA1c, nous avons tout de même refait l'expérience avec ces deux souches. Les parasites étaient à la densité suivante (Figure 82) :

Antat WT	Antat1173KOTbPLA1c
$6,3 \cdot 10^5$	$9,6 \cdot 10^5$

Figure 82 : Densité des parasites au deuxième jour des expériences d'activité PLA2

L'expérience d'activité a aussi été réalisée sur l'activité PLA1 afin d'être certain que les échantillons n'étaient pas trop pauvres en protéines et donc analysables (Figure 83).

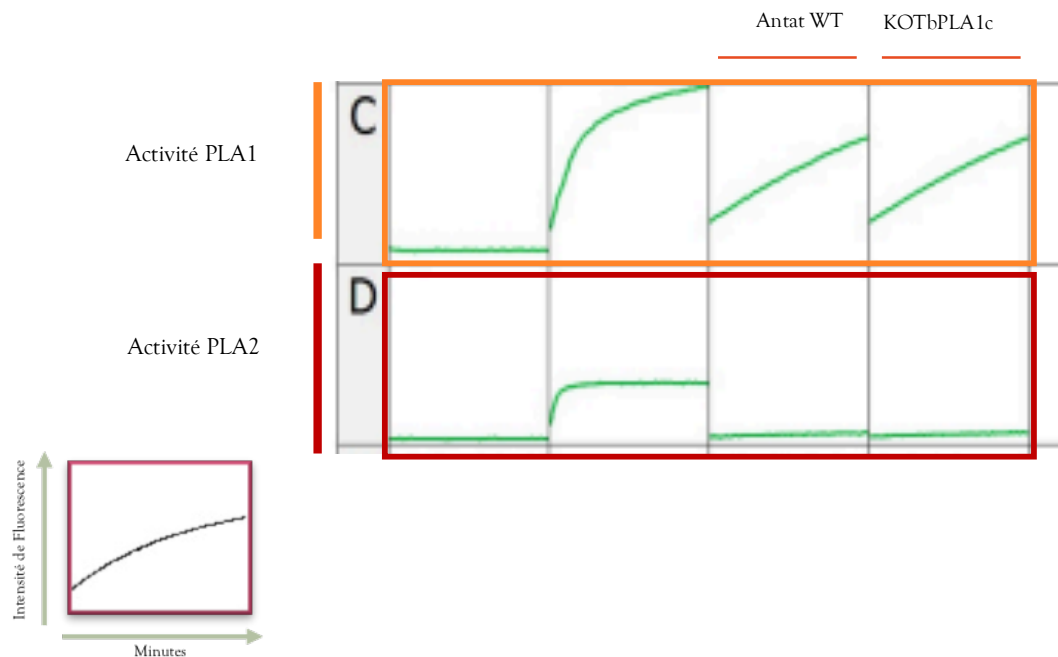


Figure 83 : Activité PLA1 et PLA2 des Antat WT et des KOTbPLA1c

Comme on peut le voir sur la Figure 83, les extraits sont bien pourvus d'activité PLA1 mais non d'activité PLA2. Ces résultats confirment non seulement nos premières observations mais en plus nous permettent de proposer que l'activité PLA2 est régulée au cours de la croissance ou du cycle des parasites.

Pendant la phase de croissance exponentielle, les cellules fabriqueraient beaucoup de PLA1, peut-être pour acquérir les lipides venant de l'extérieur du parasite, expliquant que l'activité PLA1 est toujours intense dans le milieu de culture. A l'inverse, l'activité PLA2 serait peu présente et seulement visible quand le milieu commence à s'appauvrir en sérum et donc en lipides. Elle serait peut-être plus impliquée dans le recyclage, alors nécessaire pour pourvoir la cellule en lipides et permettre de continuer sa croissance.

3.4 Stratégie d'étude de nouvelles combinaisons de mutants de phospholipases

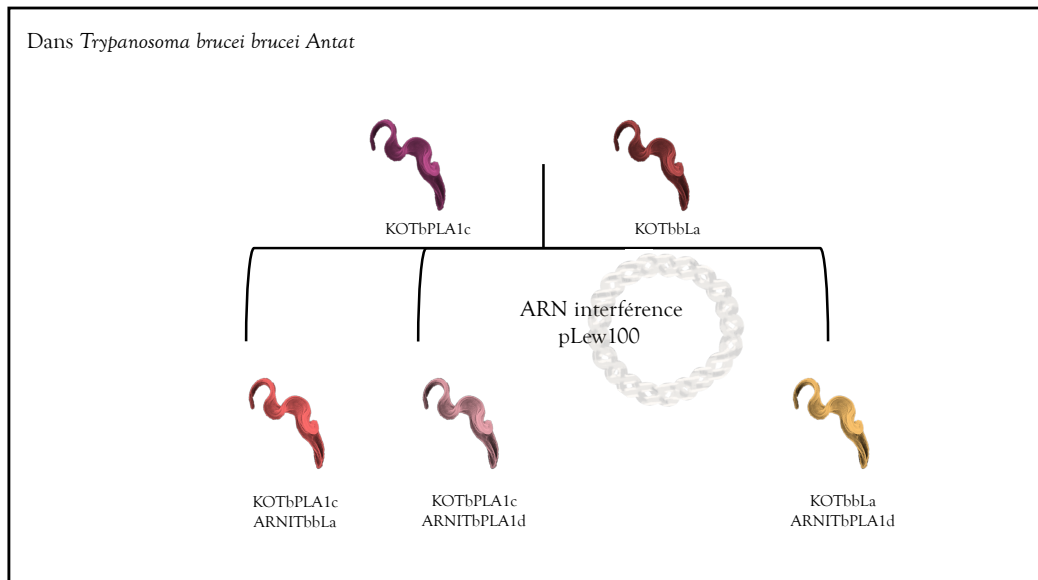


Figure 84 : Stratégie d'étude des mutants *KOTbPLA1c* et *KOTbbLa* avec des combinaisons d'ARNi

Grâce à la même stratégie que celle adoptée précédemment (Figure 71), nous avons pu obtenir les dernières combinaisons de mutants qu'il nous fallait pour éteindre conjointement deux gènes à activité phospholipase putative. Nous avons donc combiné les *KOTbPLA1c* et *KOTbbLa* avec les ARNi des autres gènes étudiés (Figure 84).

3.4.1 Courbe de croissance des KOTbPLA1c et KOTbbLa et de leur ARNi combinés

Sur la Figure 85, après une légère divergence à J4, la courbe de tendance repart à l'identique entre les différents mutants testés, ce qui induit un décalage mais non pas une différence de croissance.

En effet la pente, précisant la tendance de la courbe, redevient la même à partir du 5^{ème} point (Figure 85). On peut conclure que dans des conditions de croissance normales, les parasites ne sont pas clairement sensibles à la perte de deux phospholipases.

Etude de la de croissance des KOPLA1c et KOTbbLa et leurs ARNi combinés

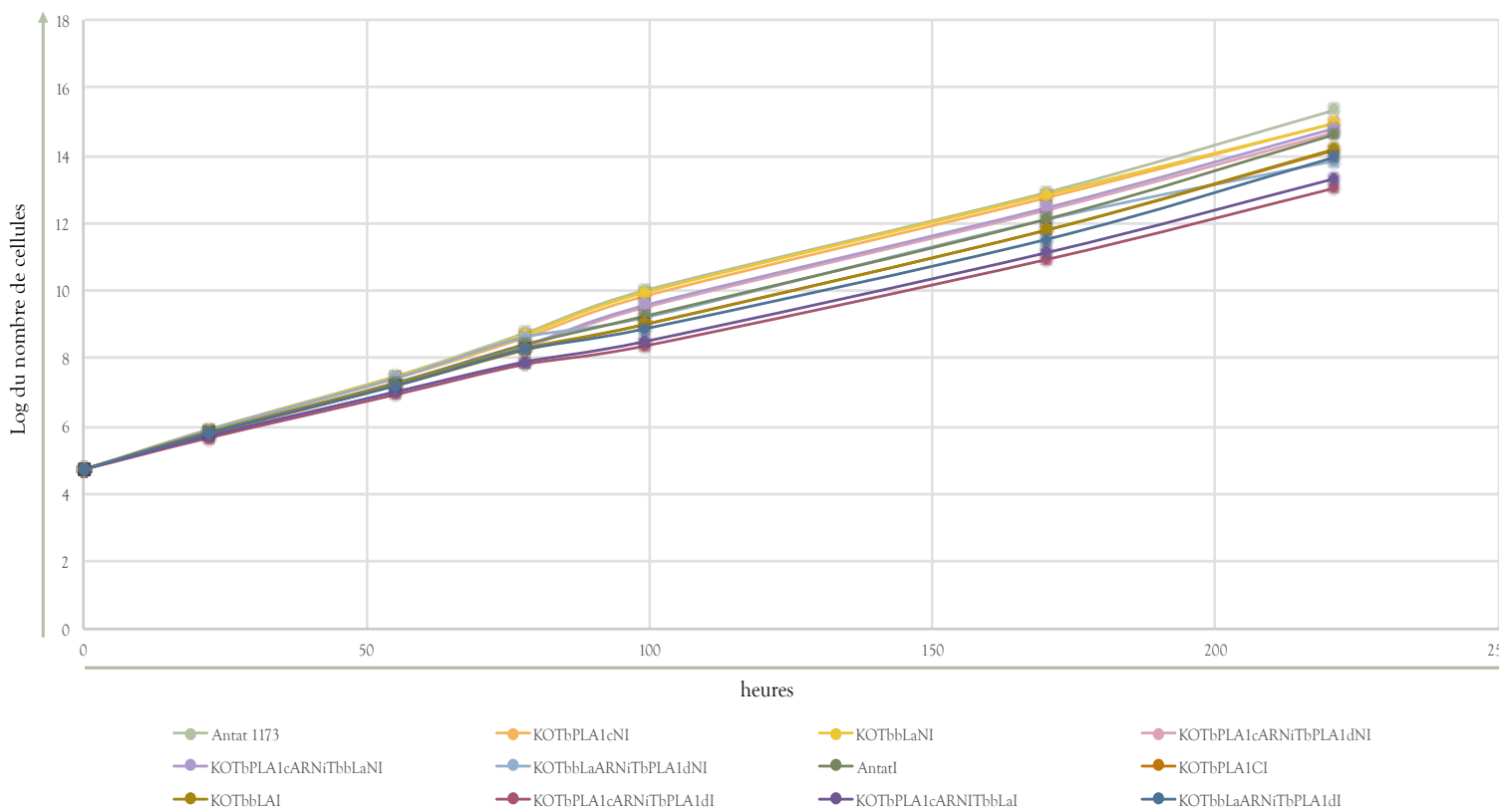


Figure 85 : Courbe de croissance des mutants KOTbbLa et KOTbPLA1c et leurs ARNi

Nous avons aussi effectué, à la suite de cette courbe, une légère courbe de croissance sur les mutants induits, en les passant à 3 % de SVF (Figure 86).

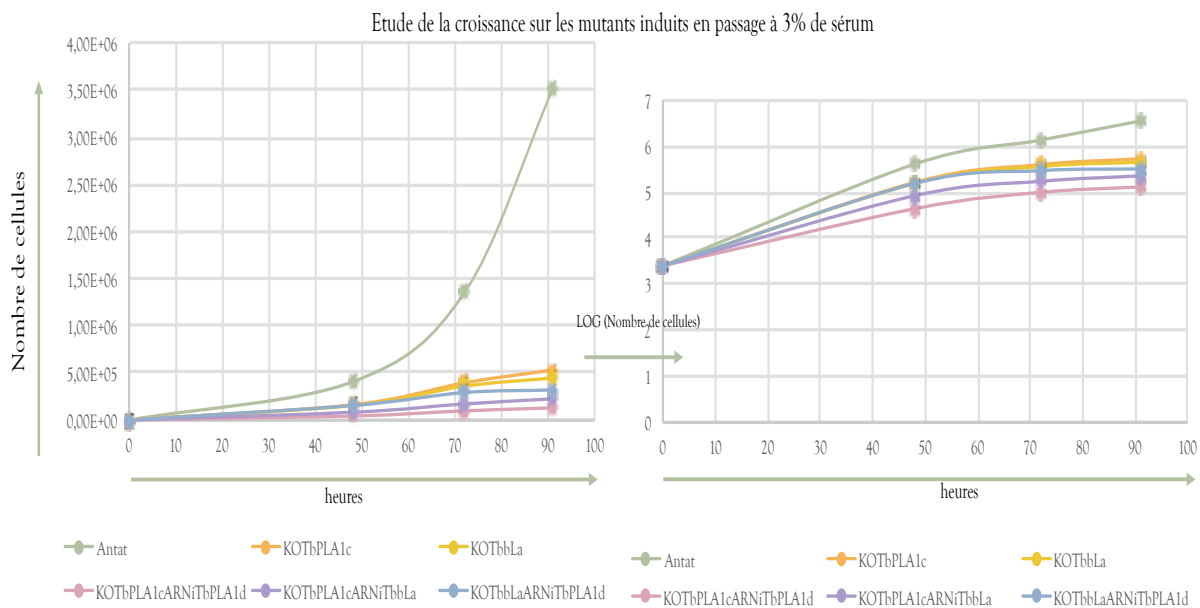


Figure 86 : Courbe de croissance des mutants des KOTbPLAc et KOTbLa induits après passage à 3% de sérum dans le milieu de culture

A gauche courbe avec le nombre de cellules, à droite courbe logarithmique.

On observe (Figure 86) la croissance stable des Antat sauvages à 3 % de sérum et une difficulté pour les mutants à s'adapter à ce nouveau milieu. Il est possible que ces mutants puissent s'adapter à une concentration basse en sérum mais que les processus impliqués dans cette adaptation mettent du temps à se mettre en place. Une explication du résultat de cette courbe pourrait impliquer un passage ici trop brutal à une concentration basse en SVF. Nous avons observé à la suite de cette courbe que les parasites KOTbPLA1cARNiTbPLA1d ont l'air les plus sensibles. Alors que les KOTbPLA1c et KOTbLa finissent par repartir, ces KOTbPLA1cARNiTbPLA1d ne se multiplient plus. Les autres doubles KO/ARNi testés, ne semblent pas beaucoup se diviser non plus. Les mutants créés à partir du KOTbPLA1b semblent s'adapter plus facilement. Cependant, les KOTbPLA1c et KOTbLa ont déjà été testés lors d'une courbe de croissance dans laquelle le milieu était pauvre en sérum (Figure 78) et semblaient s'adapter plus facilement. Ces expériences méritent donc d'être approfondies pour être certain que les doubles KO de ces mutants se trouvent effectivement démunies en absence de lipides.

3.4.2 L'activité PLA1 et PLA2 des mutants des KOTbPLA1c et KOTbLa

Afin de tester les différentes activités phospholipases de ces divers mutants, nous avons procédé de la même manière que lors des mutants KOTbPLA1b. Nous avons effectué une expérience d'activité PLA1 et PLA2 grâce aux kits EnzCheck® contenant les substrats fluorescents. Ces expériences ont été effectuées en triplicat technique pour les deux activités et une partie des échantillons a été réservée afin d'être utilisé lors d'un test de Pierce. Ce test permet de déterminer la quantité de protéine dans chaque échantillon. Chaque dépôt comprenait 10^7 cellules. Cette expérience nous a permis de normaliser l'activité à la fois sur un nombre de cellules et sur une quantification de protéine afin d'observer quelle technique était la plus stable. En effet, nous avons émis des doutes sur la taille des cellules qui varient selon les souches et donc déterminent la quantité de protéines de chaque échantillon. Ici, nous avons seulement des parasites de la souche Antat, il ne devrait donc pas y avoir de divergence comme celles observées entre les souches Antat et 427.

D'après ces expériences, on remarque que la stabilité de l'activité PLA1 est remarquable, que les cellules soient induites ou non et vis à vis de n'importe quel mutant KO.

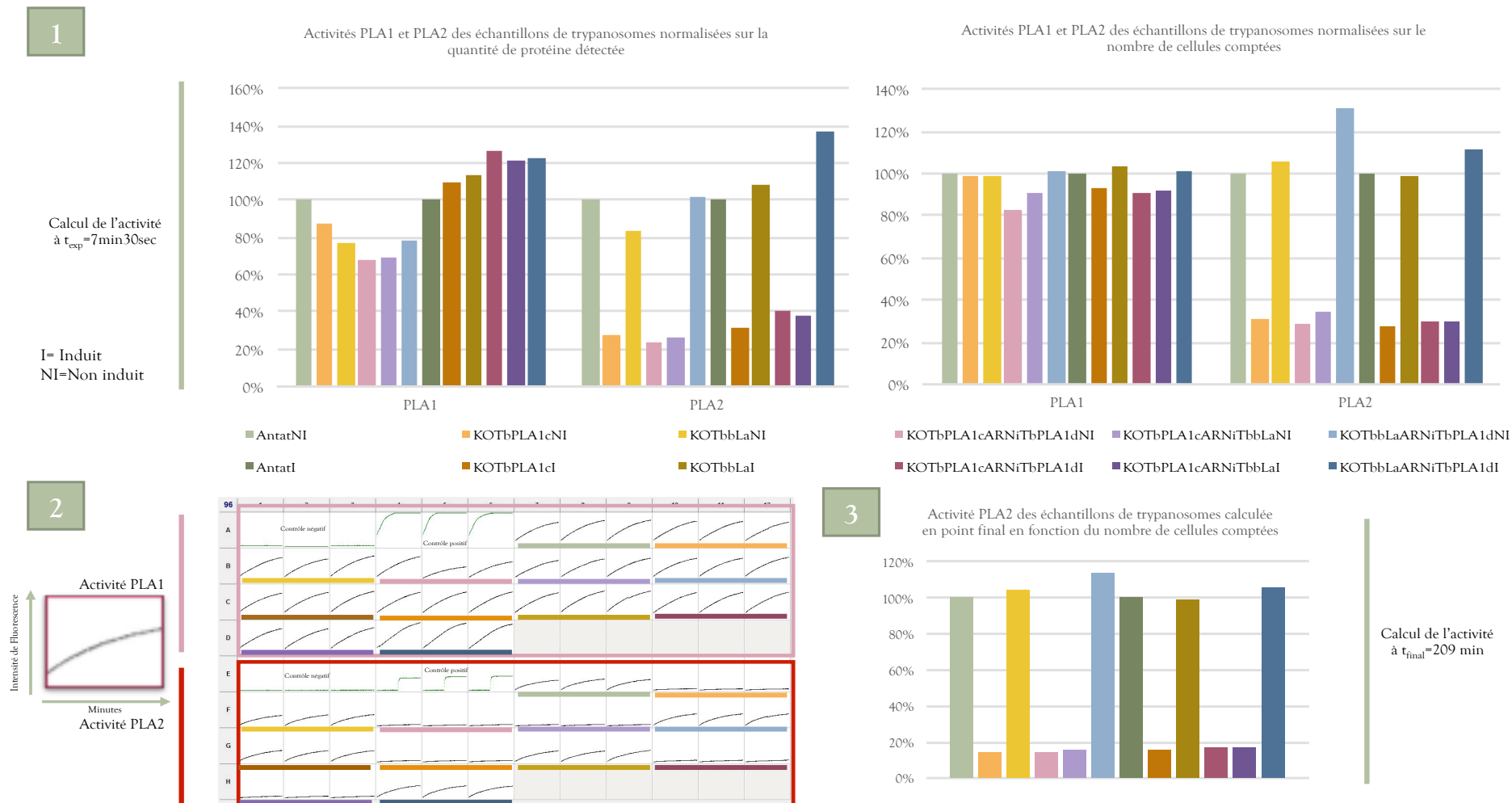


Figure 87 : Activité PLA1 et PLA2 des mutants *KOTbPLA1c* et *KOTbbLa*.

1 = Représentation de l'activité PLA1 et PLA2 en fonction à gauche de la quantité de protéines et à droite de la quantité de cellules durant la phase exponentielle. 2 = Évolution de l'activité des échantillons dans le temps : En vert activité PLA1 et en rouge activité PLA2. 3 = Activité PLA2 en point terminal

Dans la Figure 87-1, la normalisation par rapport à la quantité de protéine semble pourtant moins stable que la normalisation cellulaire. Il faut noter que le cytomètre (Guava) utilisé pour le comptage cellulaire est d'une grande précision et d'une grande reproductibilité. La quantité de cellules comptées semble donc ici plus fiable, si l'on considère que les mutants ne modifient en rien l'activité PLA1. Tester cette activité PLA1 nous a permis aussi de valider les échantillons testés ensuite en activité PLA2.

Concernant l'activité PLA2 nous avons effectué deux calculs à partir de la Figure 87-2. Le premier permet d'aborder l'activité PLA2 lors de la phase exponentielle (Figure 87-1), où le substrat est en excès par rapport aux enzymes et de juger de l'activité de ces dernières. A la vitesse maximale (V_{max}) (Figure 87-3), l'aspect visuel est plus parlant et donne le même résultat de proportion entre les différents mutants. Dans tous les cas, quatre conclusions apparaissent à la lecture de ces graphiques.

- Il existe une activité PLA2 dans le trypanosome africain et cette activité est en majorité portée par notre candidat TbPLA1c, ce qui va à l'encontre de plusieurs résultats publiés (Ridgley et Ruben 2001). En effet, en absence de TbPLA1c, l'activité PLA2 du kit a presque entièrement disparu (Figure 87-2).
- Il existe une activité résiduelle PLA2, différente du bruit de fond, qui se situe aux alentours de 20% de l'activité totale PLA2 que l'on peut déterminer grâce à ce test.
- Aucun autre candidat testé ne semble avoir d'activité PLA2, la cellule ne semble pas compenser l'activité PLA2 comme elle compense la PLA1.
- La quantité d'enzymes à activité PLA2 semble faible comparée à l'activité PLA1, qui lors de délétions successives de gènes ne semble pas être affectée.

On peut penser que l'activité résiduelle PLA2 est le fait d'une lipase à l'activité non spécifique ou due à une succession d'activités enzymatiques décrites dans l'article de (Ridgley et Ruben 2001). Il ne semble toutefois pas anormal que l'activité PLA2 soit faible dans le parasite étant donné la toxicité potentielle de ces enzymes. De même, le nombre d'enzymes ne change pas dans le cycle cellulaire, comme le montrent les premières données que nous avons présentées sur TbPLA1c (Figure 62). Cependant ces résultats n'ont pas été obtenus en situation de stress ou *in vivo*, avec une concentration parasitaire qui peut être très supérieure à 10^6 parasites/mL.

De nouvelles investigations doivent avoir lieu pour connaître le rôle de cette enzyme si spéciale, qui semble ne s'exprimer qu'en situation particulière où la densité parasitaire est élevée.

Si on compare le profil d'activité de PLA1 et PLA2 dans le parasite, il semble que l'activité PLA2 soit une activité non nécessaire à la croissance du parasite car elle n'est pas compensée par un autre gène lors de la délétion du gène qui porte probablement la majorité de son activité. Si cette enzyme était nécessaire aux processus métaboliques de base et à l'homéostasie du parasite, on peut imaginer que le parasite se multiplierait moins vite en son absence ou qu'une autre enzyme effectuerait l'activité manquante. Une autre hypothèse serait que seulement 20% de l'activité PLA2 est nécessaire à la survie du parasite et c'est pourquoi nous n'observons pas de compensation fonctionnelle sur les expériences d'activité.

Par comparaison l'activité PLA1 semble constante quelles que soient les délétions effectuées. Comme si à l'inverse de la PLA2, elle était nécessaire à l'activité basale du parasite. Deux profils fonctionnels s'opposent donc pour ces activités PLA.

4 Discussion des résultats

La proposition initiale de mon travail portait sur l'hypothèse que les phospholipases du parasite et notamment celles à activité PLA1, très présentes dans le trypanosome, pouvaient avoir une action hémolytique envers l'hôte parasité et agir de cette façon en tant que facteur de virulence dont il est important de mesurer la valeur (Tizard et al. 1978).

4.1 TbPLA1b

Après avoir longuement travaillé sur le premier candidat à activité lipase, TbPLA1b, qui possède le pentapeptide catalytique G-X-S-X-G, nous avons conclu que l'étude de cette lipase particulière était insuffisante pour appréhender la totalité de l'activité PLA1 des parasites. Nous savions par ailleurs que ce n'est pas la seule enzyme à activité PLA1 dans les trypanosomes africains. Cette activité conséquente avait été décrite il y a bien longtemps (Hambrey, Mellors, et Tizard 1981) et le Dr. Richmond a déjà identifié et étudié un candidat, TbPLA1a (Richmond et Smith 2007a).

Cependant, nos études ont permis de montrer une localisation originale duale, avec une répartition à la fois glycosomale et cytoplasmique de cette enzyme. Afin de déterminer si cette protéine avait une troisième localisation, membranaire, des expériences complémentaires de mutation d'une cystéine ont été réalisées. En effet, les cystéines peuvent être palmitoylées, ce qui permet un adressage membranaire des protéines. Ces expériences ne nous ont pas permis de conclure à une localisation membranaire.

La question de la sécrétion de TbPLA1b a aussi été soulevée. Les premières études sur le sécrétome des trypanosomes africains suggéraient que cette protéine en faisait partie (Geiger et al. 2010). Nous avons pu confirmer, par nos expériences de « sécrétion-excrétion » que TbPLA1b est effectivement sécrétée par le parasite sous sa forme sanguine. Nous avons également pu mettre en évidence que la fraction sécrétée de TbPLA1b serait la fraction cytoplasmique. En effet, dans le KOTbPLA1b, lorsque nous avons réexprimé TbPLA1b avec un site consensus (SKL) d'adressage aux glycosomes, nous n'observons plus de TbPLA1b dans les sécrétomes des parasites. On peut imaginer qu'il y aurait une régulation de TbPLA1b par sa compartimentalisation et que cette

dernière serait disponible à la sécrétion par le biais d'une sécrétion dite « classique » (poche flagellaire) et non « atypique », excrétion de glycosomes.

L'infection par les trypanosomes africains induit aussi la formation, par les hôtes contaminés, d'anticorps spécifiques contre TbPLA1b. Ces résultats peuvent être exploités dans le but de faire des tests sérologiques de dépistage type ELISA par exemple. Ces observations font d'ailleurs l'objet d'une autre étude réalisée dans le laboratoire où j'ai fait ma thèse.

Des recherches sur la toxicité éventuelle de TbPLA1b pour le parasite ont été effectuées. L'utilisation d'une surexpression protéique, médiée par un plasmide, de différents mutants de localisation de cette protéine, nous a montré que cette dernière n'est pas toxique, qu'elle soit surexprimée dans les glycosomes ou dans le cytoplasme. Les parasites ont, dans les conditions de culture, une vitesse de croissance en tous points similaire aux cellules sauvages. Par contre, l'observation de ces résultats nous a permis d'émettre l'hypothèse que TbPLA1b effectuait une oligomérisation avant son entrée dans les glycosomes. En effet, une réexpression de TyTbPLA1b-SKS dans une souche sauvage comportant deux allèles natifs du gène, entraîne une localisation partielle mais visible de la TyTbPLA1b-SKS dans les glycosomes. Ce résultat est intéressant dans la mesure où nous avons montré dans le KOTbPLA1bTyTbPLA1b-SKS une localisation uniquement cytoplasmique de la protéine.

Le type d'oligomère a donc fait l'objet de la question suivante et nous avons démontré par la réalisation d'un gel natif que le poids de cet oligomère correspondait à celui d'un octamère de la protéine.

Les expériences de cristallisation de TbPLA1b commencées pendant ma thèse se poursuivront par la suite afin de comparer la structure de notre candidat à d'autres structures de PLA connues et de découvrir comment cet octamère peut s'agencer dans l'espace.

Malgré nos recherches et nos hypothèses, nous n'avons pu répondre à la question concernant la fonction exacte de TbPLA1b, c'est-à-dire quel est son substrat préférentiel et quels sont les mécanismes cellulaires activés par l'action de cette protéine.

En effet, pourquoi cette enzyme est bi-compartmentée ? A quoi peut-elle servir dans un contexte énergétique dans les glycosomes ?

Dans l'état actuel des connaissances, les glycosomes sont des organites spécialisés dans le métabolisme énergétique du parasite (Allmann et Bringaud 2017). Il est donc à propos de penser que si TbPLA1b se retrouve en partie dans les glycosomes, c'est qu'elle est utile dans la production d'énergie.

Si l'on revient sur les études phylogénétiques de TbPLA1b, la localisation glycosomale n'est pas évidente. En effet, le site SKS apparaît très tard dans l'évolution et seulement chez certains trypanosomatides. *Alors que la structure générale de la protéine, avec les différents domaines décrits pour l'activité, est conservée jusqu'au génome humain, à quoi peut donc servir cette soudaine localisation duale ?*

Deux hypothèses trouvent leur place :

- Cette apparition reste relativement tardive à l'échelle de l'évolution et ne sera peut-être pas conservée. Il se peut que déjà certaines souches de parasites *Trypanosoma brucei brucei* ne possèdent plus le SKS, si cela n'apporte rien à l'organisme. Par ailleurs, il est important de noter, que jusqu'à récemment, le SKS terminal de la TbPLA1b n'était pas annoté sur le génome de la souche 427 sur la base de données TritrypDB. Ce motif spécifique, n'a été rajouté sur la banque de données que lors d'un second séquençage, durant ma thèse pour être en accord avec le génome de la souche *Trypanosoma brucei brucei* 927, qui elle, possédait déjà cette annotation. Cependant, parce que cela a été modifié pour deux parasites qui possèdent en théorie le même génome, on peut supposer qu'il faudrait séquencer la TbPLA1b dans les autres kinétoplastidés pour être certain que le SKS n'a pas été oublié dans le séquençage automatique des autres génomes.
- La deuxième hypothèse a été élaborée en communion du travail de l'équipe de recherche dans laquelle j'ai fait ma thèse. En effet, l'objet principal d'étude de l'équipe est l'acquisition de substrats énergétiques par le parasite pour réaliser son métabolisme et sauvegarder son homéostasie. Dans la forme procyclique d'un parasite mutant pour lequel la glycolyse est irréalisable, les cellules utilisent le glycérol pour palier leur besoin énergétique. Or, la source principale de glycérol en absence de glucose est exclusivement lipidique. Par conséquent, les

enzymes permettant de couper les lipides pour former du glycérol sont des candidats de choix. Ce processus métabolique doit avoir lieu dans les glycosomes et c'est pourquoi TbPLA1b, qui possède à la fois une activité PLA1 et lysoPLA serait un candidat idéal étant donné sa localisation glycosomale.

Les résultats préliminaires montrent que les parasites ne pouvant effectuer la glycolyse ne survivent pas dans un milieu sans glucose en l'absence de TbPLA1b. Ils montrent avec cette expérience que TbPLA1b est une enzyme-clé du métabolisme et permet la génération de glycérol par l'hydrolyse d'acides gras.

Cependant, étant donné nos investigations sur la quantité de lipases à activité PLA1, nous pouvons imaginer que c'est l'activité lysophospholipase de TbPLA1b qui serait essentielle. En effet, cette enzyme est la seule à activité lysophospholipase supposée, tandis qu'il existe beaucoup de lipases à activité PLA1, notamment la lipase TbPLA1a décrite par le Dr. Richmond. Ceci doit être contrebalancée par le fait que TbPLA1b est aujourd'hui la seule dont on peut dire qu'elle est glycosomale.

Notre hypothèse générale est que dans cette voie métabolique, à la fois TbPLA1b et la TbPLA1c sont essentielles. En effet, l'objectif de libération du glycérol ne peut être réalisé que par l'activité successive d'une PLA2 suivi d'une lysophospholipase, car on ne connaît pas aujourd'hui chez les trypanosomes de lipase ayant une activité PLB.

La question de la sécrétion de TbPLA1b reste essentielle. Cette protéine n'est pas toxique d'après nos expériences, elle n'a donc pas d'intérêt de détoxification à être sécrétée mais bien un intérêt fonctionnel. De plus, elle ne semble pas être un facteur de virulence dans le sens premier du terme. Elle n'induit par exemple pas une hémolyse directe. En effet, la protéine mise en contact avec les globules rouges, n'induit pas leur lyse (expérience faite au laboratoire).

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- Soit la protéine exerce son activité lysophospholipase contre les lysophospholipides présents dans le sang de l'hôte, qui peuvent avoir une action délétère sur la structure du parasite. En effet, en s'incluant dans la bicouche phospholipidique de la membrane, les lysophospholipides déstabilisent ses constituants, induisant une lyse plus rapide des parasites. Il serait donc

nécessaire au parasite d'hydrolyser ces lysophospholipides exogènes pour se protéger de leur activité délétère.

- Une autre hypothèse provient de la littérature et explique que la génération de LPC induit une augmentation de 3 à 6 fois la parasitémie. C'est pourquoi les parasites génèrent du LPC avant de se faire injecter par la glossine (Mesquita et al. 2008). On pourrait donc imaginer que ce LPC produit par l'intermédiaire de cette TbPLA1b sécrétée serait favorable à un environnement de multiplication parasitaire.
- D'autre part, il a été prouvé que le LPC inhibe la production de NO par les macrophages de l'hôte stimulé par *Trypanosoma cruzi*, on peut donc émettre cette hypothèse de virulence secondaire et d'immunomodulation (María Laura Belaunzarán et al. 2013). Cet environnement dépourvu de NO serait lui aussi favorable à la multiplication parasitaire.
- Même s'il a été prouvé que les PLA1 n'ont pas une action d'hémolyse directe, par ses deux mécanismes d'action, TbPLA1b pourrait relarguer des acides gras libres qui sont toxiques pour la membrane des globules rouges. Ces globules rouges seraient modifiés dans leur structure et reconnus comme non adaptés par le système immunitaire de l'hôte et rentreraient dans le processus d'érythrophagocytose induisant une anémie indirecte. Il n'est donc pas exclu que TbPLA1b ait un rôle à jouer dans l'anémie, même si l'hypothèse immunologique d'emballage du système immunitaire a été privilégiée.

Dans les publications de lipidomique que l'on peut trouver dans la littérature, les expériences les plus utilisées pour déterminer l'activité des lipases sont l'étude de micelles à base de phospholipides. Parmi les expériences effectuées à St Andrews, la formation de micelles à base de tritonX100 et de phospholipides n'a pas fonctionné. Deux explications peuvent nous permettre de comprendre pourquoi. Tout d'abord, il se peut que les phospholipases purifiées que nous avons étudiées ne soient pas actives sur les phospholipides choisis. De plus elles ont peut-être besoin de partenaires métaboliques non présents dans les micelles. Le deuxième problème est le bruit de fond constant du tritonX100 quand il est traité par le spectromètre de masse. Ce bruit de fond a tendance à cacher les pics correspondants aux lipides et rendre ininterprétables les

résultats. C'est pourquoi nous avons opté pour l'étude de l'activité des enzymes sur des lysats parasitaires d'extraits totaux.

Les expériences de lipidomique ont été très difficiles à analyser. En effet, l'extraction est très compliquée à reproduire sur deux jours différents (solvants volatiles). De plus les protéines encore présentes dans l'échantillon peuvent entraîner un bruit de fond qui gêne l'interprétation des spectres. Au-delà des erreurs de manipulateur et du bruit de fond, le spectromètre de masse ne donnait pas tout le temps les mêmes masses pour les mêmes lipides. Une variation de 1 à 2 Da n'était pas rare. Trouver des lipides correspondant à ces masses non exactes n'était pas aisé.

Avec la base de données LIPID MAPS, il est très difficile de déterminer le lipide représenté par un pic si la masse n'est pas exacte. De plus, afin de sélectionner dans la multitude de pics ceux correspondant à une sous-famille particulière de glycérophospholipides, le groupement de tête était utilisé. Par exemple, pour trouver tous les PC, un filtre permettant de conserver seulement les lipides possédant dans leur fragment une masse de 184 Da étaient représentés sur le graphique.

Grâce aux expériences de supplémentation en TbPLA1b sur les lysats d'Antat sauvage, nous avons pu néanmoins apprécier un premier argument sur l'activité lysophospholipase de cette protéine.

Concernant la possible redondance des enzymes à activité lipase, bien que nous ayons combiné un ARNiTbPLA1a (décrite par le Dr. Richmond) à notre KOTbPLA1b, l'activité totale PLA1 mesurée par le kit commercial n'est pas modifiée. Le retrait de deux gènes qui possèdent cette activité ne change ni la croissance du parasite, ni son activité. Nous pourrions imaginer que cela est dû à un substrat non adapté. Concernant TbPLA1a c'est possible car la protéine n'a pas été purifiée au laboratoire, mais concernant TbPLA1b, la protéine purifiée exerce bien une activité de lyse nette sur le substrat du kit commercial utilisé. De plus, cette activité n'est pas dépendante d'une oligomérisation. La protéine purifiée sous forme de monomère est active pour son activité PLA1. *Peut-être nécessaire de former un octamère pour exercer son activité lysophospholipase ?* En effet, il a été montré que certaines enzymes ne sont actives que sous forme de polymères, comme la protéase du VIH, qui perd totalement son activité sous forme monomérique (Roitel, s. d.). De plus, les formes oligomériques sont souvent plus stables que les formes monomères ou exercent une activité plus importante, comme la protéine TIM du

trypanosome, sous forme de dimère qui possède une activité bien supérieure à la forme monomérique. (Borchert et al. 1994).

Concernant la virulence de ces parasites, le double mutant KOTbPLA1bARNITbPLA1a a été envoyé à notre collaboratrice, le Dr. Luisa Figueiredo, afin d'effectuer des infections de souris et d'observer si la déplétion de deux des protéines à activité PLA1 entrainerait une diminution de la virulence et un retard de mortalité des souris.

Concernant les autres mutants des KOTbPLA1b, pour lesquels un ARNi a été réalisé afin d'obtenir des doubles délétions de gène, on ne peut conclure à aucune activité particulière. Les diverses courbes de croissance n'ont pas montré de retard de multiplication entre les différents parasites.

4.2 TbPLA1c

Nous avons pu démontrer que TbPLA1c, annotée sur TritypDB Phospholipase A1, possède en réalité une activité PLA2. Nous ne pouvons conclure sur l'activité PLA1 ni sur une éventuelle activité lysophospholipase car nous n'avons réussi à purifier cette enzyme qu'en Ecosse et cette expérience n'a pas pu être répétée dans le laboratoire dans lequel j'ai réalisé ma thèse, faute de temps.

Il est cependant clair que cette TbPLA1c a une activité PLA2 comme nous pouvons le voir dans le mutant KOTbPLA1c pour lequel l'activité PLA2 révélée par le kit commercial a complètement disparu. La question de sa fonction demeure. TbPLA1c ne semble pas sécrétée par le parasite mais il est certain qu'elle entre en contact direct avec l'hôte lors de la lyse parasitaire. Ce type de PLA2 cytoplasmique peut jouer un rôle dans le remodelage des glycérophospholipides, notamment en hydrolysant les PC qui pourront engendrer des LPC à leur tour hydrolysés par TbPLA1b. TbPLA1c pourrait aussi avoir une activité PAF-AH, car elle est très proche structurellement de la PAF-AH humaine. De plus, lors de la lyse parasitaire, TbPLA1c pourrait être la cause de la thrombocytémie et des désordres intravasculaires observés dans la trypanosomiase africaine comme les coagulations intravasculaires disséminées (Charles E. Davis et al. 1974)(C. E. Davis 1982).

Nous pouvons aussi noter que TbPLA1c semble s'exprimer quand les cellules sont en phase stationnaire de croissance. Elle peut donc avoir un rôle à jouer dans l'évolution du cycle parasitaire ou en situation urgente de manque de substrats. Elle agit peut-être

pour remodeler les lipides propres au parasite, pour leurs besoins métaboliques urgents, mais en dernier recours car elle serait toxique pour le parasite lui-même. Toutes ces hypothèses méritent d'être approfondies. Un des moyens serait de mettre le parasite en présence de TbPLA1c dans son milieu extérieur et de voir si la mort parasitaire survient plus vite que dans un milieu classique. Cependant, les parasites KOTbPLA1c ne semblaient pas mourir plus vite que les autres parasites en situation de stress mais les conditions particulières de l'expérience ne les laissaient pas plus de 3h30 dans ce milieu.

4.3 Réflexion sur la littérature

La revue du Dr. Belaunzaran propose que les PLA1 sont impliquées dans la virulence du parasite (María Laura Belaunzaran, Lammel, et de Isola 2011). Afin de vérifier ce postulat de virulence des PLA1, une expérience de surexpression d'une PLA1 présente dans *Trypanosoma brucei brucei* pourrait être effectuée dans un parasite dont on sait qu'il est moins virulent comme le *T. lewisi*. Si le *T. lewisi* devient plus pathogène, le rôle des PLA1 sera confirmé par une augmentation de l'anémie par exemple ou une mort des hôtes plus rapide.

Dans sa publication de 1982 (Opperdoes et van Roy 1982), le Dr. Opperdoes dit que de telles quantités d'enzymes à activité PLA1, 4 à 10 fois supérieures dans *Trypanosoma brucei* que dans les autres trypanosomes devraient être délétères au niveau soluble si elles ne sont pas contenues dans des gouttelettes lipidiques ou dans les lysosomes. Or, les deux enzymes à activité PLA1 caractérisées aujourd'hui, TbPLA1a et TbPLA1b sont solubles et cytoplasmiques. En utilisant le Nile Red, ou tout autre marqueur de gouttelettes lipidiques, on pourrait peut-être observer si ces enzymes colocalisent avec ces dernières. On pourrait aussi voir si leur répartition et celle des enzymes est modifiée selon les mutants d'intérêt. Nous avons essayé de marquer les gouttelettes lipidiques dans les cellules sanguines de trypanosome avec le Nile Red, sans succès.

Dans l'article du Dr. Belaunzaran concernant une nouvelle phospholipase A1 chez *Trypanosoma cruzi*, les chercheurs expliquent que la PLA1 retrouvée est un orthologue de celle décrite par le Pr. Smith chez *Trypanosoma brucei brucei* (María Laura Belaunzaran et al. 2013). La preuve de cette orthologie est la validation de l'anticorps

anti-TbPLA1a qui reconnaît de façon spécifique la PLA1 chez *Trypanosoma cruzi*. Or, bien que ces deux enzymes possèdent le même pentapeptide catalytique, ce ne sont pas les seules. L'orthologue le plus proche de la PLA1 de *Trypanosoma cruzi*, est une enzyme présente chez *Trypanosoma brucei brucei* et que nous avons nommé TbPLA1d (Tb927.8.7440) durant ma thèse, qui possède aussi ce même pentapeptide. De plus, si l'anticorps permettait de valider l'orthologie entre TbPLA1a et la PLA1 de *Trypanosoma cruzi* et qu'il ciblait le pentapeptide catalytique comme le précise le Dr. Belaunzaran, TbPLA1d serait aussi révélée et nous verrions deux bandes chez *Trypanosoma brucei brucei* lors de l'utilisation de l'anticorps anti-TbPLA1a.

Le Pr. Smith explique l'existence de TbPLA1a par l'acquisition d'une PLA1 de protéobactérie présente dans le microbiote de la glossine. Le *Trypanosoma cruzi* faisant partie de la famille des stercoraires n'a jamais été présent dans une glossine. L'acquisition de TbPLA1a a eu lieu après l'ancêtre commun aux deux parasites. Cela étant, il se peut simplement que TbPLA1a, TbPLA1d et la PLA de *Trypanosoma cruzi* aient un ancêtre commun encore plus ancien.

Dans la revue du Dr. Belaunzaran de 2011 ((María Laura Belaunzarán, Lammel, et de Isola 2011)), les chercheurs expliquent qu'une PLA transmembranaire pourrait protéger *Trypanosoma brucei* de fortes concentrations de LPC. La protéine TbbLa (Tb927.3.3870) pourrait être un bon candidat à cette fonction car elle possède de multiples domaines transmembranaires.

Chapitre 4 : Conclusion générale

L'étude des phospholipases du trypanosome africain n'en est qu'à son commencement. Aujourd'hui deux PLA1 ont été décrites, TbPLA1a et TbPLA1b mais nous soupçonnons que bien d'autres enzymes possèdent cette activité. La diversité des fonctions et des rôles qu'elles peuvent tenir au sein de ce parasite et en communion avec le système de son hôte reste un mystère. Il appartient donc à ceux qui voudraient s'y aventurer de pourchasser les différentes lipases afin de les localiser dans le parasite et d'appréhender leur fonction, comme une vision d'ensemble dont le but est de pourvoir au métabolisme et à la virulence du parasite. Si toutes les enzymes pouvaient être l'égale de TbPLA1b, qui, en plus de l'activité PLA1, posséderait une activité lysophospholipase, en plus de sa double localisation peut s'oligomériser sous forme d'octamère, cela ferait d'elles autant de sujets passionnants.

Concernant TbPLA1c, que nous prenions au commencement pour une PLA1, nous sommes heureux d'avoir pu confirmer et apporter de nouveaux arguments à son activité PLA2. La beauté de la découverte tient à l'expérience qui, au delà des annotations de bases de données, nous a permis de débusquer l'activité PLA2 tant discutée.

La Nature a horreur du vide, disait Aristote, et le parasite a pléthore de lipases.

Beaucoup de gènes restent encore à explorer et beaucoup de voies métaboliques à comprendre pour terminer ce puzzle auquel déjà de nouveaux candidats comme TbPLA1d et TbbLa, apportent des solutions.

Bibliographie

- Achcar, Fiona, Eduard J Kerkhoven, et Michael P Barrett. 2014. « Trypanosoma Brucei: Meet the System ». *Current Opinion in Microbiology* 20 (août): 162-69. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.06.007>.
- Acosta-Serrano, Alvaro, Erik Vassella, Matthias Liniger, Christina Kunz Renggli, Reto Brun, Isabel Roditi, et Paul T. Englund. 2001. « The Surface Coat of Procyclic Trypanosoma Brucei: Programmed Expression and Proteolytic Cleavage of Procyclin in the Tsetse Fly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (4): 1513-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1513>.
- Allmann, Stefan, et Frédéric Bringaud. 2017. « Glycosomes: A Comprehensive View of Their Metabolic Roles in T. Brucei ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 85: 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.015>.
- Antoine-Moussiaux, Nicolas, Philippe Büscher, et Daniel Desmecht. 2009. « Host-Parasite Interactions in Trypanosomiasis: on the Way to an Antidisease Strategy ». *Infection and Immunity* 77 (4): 1276-84. <https://doi.org/10.1128/IAI.01185-08>.
- Aoki, J. 2002. « Structure and function of phosphatidylserine-specific phospholipase A1 ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1582 (1-3): 26-32. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(02\)00134-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(02)00134-8).
- Aresta-Branco, Francisco, Esteban Erben, F. Nina Papavasiliou, et C. Erec Stebbins. 2019. « Mechanistic Similarities between Antigenic Variation and Antibody Diversification during Trypanosoma Brucei Infection ». *Trends in Parasitology* 35 (4): 302-15. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.011>.
- Aresta-Branco, Francisco, Margarida Sanches-Vaz, Fabio Bento, João A. Rodrigues, et Luisa M. Figueiredo. 2019. « African Trypanosomes Expressing Multiple VSGs Are Rapidly Eliminated by the Host Immune System ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (41): 20725-35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905120116>.
- Atyame Nten, Celestine Michelle, Nicolas Sommerer, Valerie Rofidal, Christophe Hirtz, Michel Rossignol, Gerard Cuny, Jean-Benoit Peltier, et Anne Geiger. 2010. « Excreted/Secreted Proteins from Trypanosome Procyclic Strains ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/212817>.
- Balashov, Konstantin. 2014. « Atomic Force Microscopy (AFM) with applications spanning from nanoscale (bio)catalysis and characterization of molecularly ordered nanostructures to molecular biology ». <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3678.3127>.
- Balmer, Oliver, Jon S. Beadell, Wendy Gibson, et Adalgisa Caccone. 2011. « Phylogeography and Taxonomy of Trypanosoma Brucei ». *PLOS Neglected Tropical Diseases* 5 (2): e961. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000961>.
- Banerjee, Hiren, Barbara Knoblach, et Richard A Rachubinski. 2019. « The early-acting glycosome biogenic protein Pex3 is essential for trypanosome viability ». *Life Science Alliance* 2 (4). <https://doi.org/10.26508/lsa.201900421>.
- Bauer, Sarah, et Meredith T. Morris. 2017. « Glycosome biogenesis in trypanosomes and the de novo dilemma ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005333>.
- Baulande, Sylvain, et Clotilde Langlois. 2010. « Les protéines à domaine patatine - Une nouvelle famille de régulateurs du métabolisme lipidique ». *médecine/sciences* 26 (2): 177-84. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010262177>.
- Belaunzarán, M. L., M. J. Wainszelbaum, E. M. Lammel, G. Gimenez, M. M. Aloise, J. Florin-Christensen, et E. L. D. Isola. 2007. « Phospholipase A1 from Trypanosoma Cruzi Infective Stages Generates Lipid Messengers That Activate Host Cell Protein Kinase c ». *Parasitology* 134 (Pt 4): 491-502. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001740>.
- Belaunzarán, María Laura, Estela María Lammel, et Elvira Luisa Durante de Isola. 2011. « Phospholipases a in Trypanosomatids ». *Enzyme Research* 2011: 392082. <https://doi.org/10.4061/2011/392082>.
- Belaunzarán, María Laura, Silvina Elizabeth Wilkowsky, Estela María Lammel, Guadalupe Giménez,

- Emanuel Bott, Manuel Alejandro Barbieri, et Elvira Luisa Durante de Isola. 2013. « Phospholipase A1: A Novel Virulence Factor in *Trypanosoma Cruzi* ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 187 (2): 77-86. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.12.004>.
- Bengaly, Z., I. Sidibe, R. Ganaba, M. Desquesnes, H. Boly, et L. Sawadogo. 2002. « Comparative Pathogenicity of Three Genetically Distinct Types of *Trypanosoma Congolense* in Cattle: Clinical Observations and Haematological Changes ». *Veterinary Parasitology* 108 (1): 1-19. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00164-4).
- Berthier, David, Simone F. Brenière, Rachel Bras-Gonçalves, Jean-Loup Lemesre, Vincent Jamonneau, Philippe Solano, Veerle Lejon, Sophie Thévenon, et Bruno Bucheton. 2016. « Tolerance to Trypanosomatids: A Threat, or a Key for Disease Elimination? » *Trends in Parasitology* 32 (2): 157-68. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.001>.
- Black, S. J., et J. M. Mansfield. 2016. « Prospects for Vaccination against Pathogenic African Trypanosomes ». *Parasite Immunology* 38 (12): 735-43. <https://doi.org/10.1111/pim.12387>.
- Borchert, T V, R Abagyan, R Jaenicke, et R K Wierenga. 1994. « Design, creation, and characterization of a stable, monomeric triosephosphate isomerase. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (4): 1515-18.
- Borek, Sławomir, Szymon Stefaniak, Jan Śliwiński, Małgorzata Garnczarska, et Małgorzata Pietrowska-Borek. 2019. « Autophagic Machinery of Plant Peroxisomes ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (19). <https://doi.org/10.3390/ijms20194754>.
- Bossard, Géraldine, Gérard Cuny, et Anne Geiger. 2013. « Secreted Proteases of *Trypanosoma Brucei* Gambiense: Possible Targets for Sleeping Sickness Control? » *BioFactors (Oxford, England)* 39 (4): 407-14. <https://doi.org/10.1002/biof.1100>.
- Bott, Emanuel, María Gabriela López, Estela María Lammel, Ivanna Emilce Carfagna, Elvira Luisa Durante de Isola, Paula Ruybal, Oscar Taboga, Guadalupe Gimenez, et María Laura Belaunzarán. 2020. « Cellular Localization, Cloning and Expression of *Leishmania Braziliensis* Phospholipase A1 ». *Microbial Pathogenesis* 141 (avril): 104010. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104010>.
- Bowes, A. E., A. H. Samad, P. Jiang, B. Weaver, et A. Mellors. 1993. « The Acquisition of Lysophosphatidylcholine by African Trypanosomes. » *Journal of Biological Chemistry* 268 (19): 13885-92.
- Brun, R., H. Hecker, et Z. R. Lun. 1998. « *Trypanosoma Evansi* and *T. Equiperdum*: Distribution, Biology, Treatment and Phylogenetic Relationship (a Review) ». *Veterinary Parasitology* 79 (2): 95-107. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(98\)00146-0](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(98)00146-0).
- Burke, John E., et Edward A. Dennis. 2009. « Phospholipase A2 Structure/Function, Mechanism, and Signaling ». *Journal of Lipid Research* 50 Suppl (avril): S237-242. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>.
- Camara, Mariame, Alseny M'mah Soumah, Hamidou Ilbouldo, Christelle Travaillé, Caroline Clucas, Anneli Cooper, Nono-Raymond Kuispond Swar, et al. 2020. « Extravascular Dermal Trypanosomes in Suspected and Confirmed Cases of Gambiense Human African Trypanosomiasis ». *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, juillet. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa897>.
- Capewell, Paul, Christelle Cren-Travaillé, Francesco Marchesi, Pamela Johnston, Caroline Clucas, Robert A Benson, Taylor-Anne Gorman, et al. s. d. « The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes ». *eLife* 5. Consulté le 20 novembre 2019. <https://doi.org/10.7554/eLife.17716>.
- Capewell, Paul, Nicola J. Veitch, C. Michael R. Turner, Jayne Raper, Matthew Berriman, Stephen L. Hajduk, et Annette MacLeod. 2011. « Differences between *Trypanosoma brucei* gambiense Groups 1 and 2 in Their Resistance to Killing by Trypanolytic Factor 1 ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001287>.
- Colasante, C, Ellis M, Ruppert T, et Voncken F. 2006. « Comparative Proteomics of Glycosomes from Bloodstream Form and Procyclic Culture Form *Trypanosoma Brucei Brucei* ». *Proteomics*. Proteomics. juin 2006. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500668>.
- Colasante, Claudia, Frank Voncken, Theresa Manful, Thomas Ruppert, Aloysius G M Tielens, Jaap J van Hellemond, et Christine Clayton. 2013. « Proteins and lipids of glycosomal membranes from

- Leishmania tarentolae and Trypanosoma brucei ». *F1000Research* 2 (janvier). <https://doi.org/10.12688/f1000research.2-27.v1>.
- Cooper, Anneli, Paul Capewell, Caroline Clucas, Nicola Veitch, William Weir, Russell Thomson, Jayne Raper, et Annette MacLeod. 2016. « A Primate APOL1 Variant That Kills Trypanosoma Brucei Gambiense ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10 (8): e0004903. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004903>.
- Cooper, Anneli, Hamidou Ilboudo, V. Pius Alibu, Sophie Ravel, John Enyaru, William Weir, Harry Noyes, et al. 2017. « APOL1 Renal Risk Variants Have Contrasting Resistance and Susceptibility Associations with African Trypanosomiasis ». *ELife* 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.25461>.
- Courtioux, Bertrand. 2005. « Etude des mécanismes inflammatoires au cours de la trypanosomose humaine africaine: applications en diagnostic et en thérapeutique ». <http://www.theses.fr>. Thesis, Limoges. <http://www.theses.fr/2005LIMO100B>.
- Coustou, Virginie, Fabien Guegan, Nicolas Plazolles, et Théo Baltz. 2010. « Complete In Vitro Life Cycle of Trypanosoma Congolense: Development of Genetic Tools ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (3): e618. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000618>.
- Cox, Francis E. G. 2004. « History of Sleeping Sickness (African Trypanosomiasis) ». *Infectious Disease Clinics of North America* 18 (2): 231-45. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.004>.
- Cuypers, Bart, Frederik Van den Broeck, Nick Van Reet, Conor J. Meehan, Julien Cauchard, Jonathan M. Wilkes, Filip Claes, et al. 2017. « Genome-Wide SNP Analysis Reveals Distinct Origins of Trypanosoma Evansi and Trypanosoma Equiperdum ». *Genome Biology and Evolution* 9 (8): 1990-97. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx102>.
- Davis, C. E. 1982. « Thrombocytopenia: A Uniform Complication of African Trypanosomiasis ». *Acta Tropica* 39 (2): 123-33.
- Davis, Charles E., Robert S. Robbins, Richard D. Weller, et Abraham I. Braude. 1974. « Thrombocytopenia in Experimental Trypanosomiasis ». *Journal of Clinical Investigation* 53 (5): 1359-67.
- Dean, Samuel, Jack D. Sunter, et Richard J. Wheeler. 2017. « TrypTag.Org: A Trypanosome Genome-Wide Protein Localisation Resource ». *Trends in Parasitology* 33 (2): 80-82. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.10.009>.
- Dean, Samuel, Jack Sunter, Richard J. Wheeler, Ian Hodgkinson, Eva Gluenz, et Keith Gull. 2015. « A Toolkit Enabling Efficient, Scalable and Reproducible Gene Tagging in Trypanosomatids ». *Open Biology* 5 (1): 140197. <https://doi.org/10.1098/rsob.140197>.
- Desquesnes, Marc, Alan Dargantes, De-Hua Lai, Zhao-Rong Lun, Philippe Holzmuller, et Sathaporn Jittapalpong. 2013. « Trypanosoma evansi and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects ». *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/321237>.
- Desquesnes, Marc, et Mamadou Lamine Dia. 2004. « Mechanical Transmission of Trypanosoma Vivax in Cattle by the African Tabanid Atylotus Fuscipes ». *Veterinary Parasitology* 119 (1): 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.015>.
- Desquesnes, Marc, Philippe Holzmuller, De-Hua Lai, Alan Dargantes, Zhao-Rong Lun, et Sathaporn Jittapalpong. 2013. « Trypanosoma evansi and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects ». *BioMed Research International* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/194176>.
- Desta, Mulugeta, Desta Beyene, et Samuel Haile. s. d. « Trypanosome Infection Rate of Glossina Pallidipes and Trypanosomiasis Prevalence in Cattle in Amaro Special District of Southern Ethiopia », 8.
- Devedjiev, Y., Z. Dauter, S. R. Kuznetsov, T. L. Jones, et Z. S. Derewenda. 2000. « Crystal Structure of the Human Acyl Protein Thioesterase I from a Single X-Ray Data Set to 1.5 Å ». *Structure (London, England: 1993)* 8 (11): 1137-46. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00529-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00529-3).
- Dickie, Emily A., Simon A. Young, et Terry K. Smith. 2019. « Substrate Specificity of the Neutral Sphingomyelinase from Trypanosoma Brucei ». *Parasitology* 146 (5): 604-16. <https://doi.org/10.1017/S0031182018001853>.
- Dorlo, Thomas P. C., Manica Balasegaram, Jos H. Beijnen, et Peter J. de Vries. 2012. « Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis ». *The Journal of*

Antimicrobial Chemotherapy 67 (11): 2576-97. <https://doi.org/10.1093/jac/dks275>.

Durrani, Hina, Marshall Hampton, Jon N. Rumbley, et Sara L. Zimmer. 2020. « A Global Analysis of Enzyme Compartmentalization to Glycosomes ». *Pathogens* 9 (4). <https://doi.org/10.3390/pathogens9040281>.

Eintracht, J, R Maathai, A Mellors, et L Ruben. 1998. « Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. » *Biochemical Journal* 336 (Pt 3): 659-66.

Emmerich, J., O. U. Beg, J. Peterson, L. Previato, J. D. Brunzell, H. B. Brewer, et S. Santamarina-Fojo. 1992. « Human Lipoprotein Lipase. Analysis of the Catalytic Triad by Site-Directed Mutagenesis of Ser-132, Asp-156, and His-241 ». *The Journal of Biological Chemistry* 267 (6): 4161-65.

Engstler, Markus, Lutz Thilo, Frank Weise, Christoph G. Grünfelder, Heinz Schwarz, Michael Boshart, et Peter Overath. 2004. « Kinetics of Endocytosis and Recycling of the GPI-Anchored Variant Surface Glycoprotein in *Trypanosoma Brucei* ». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 7): 1105-15. <https://doi.org/10.1242/jcs.00938>.

Esterhuizen, J. 2015. « Disease Prevention and Anti-Vector Campaigns: Insects ». *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* 34 (1): 265-75.

Fahy, Eoin, Shankar Subramaniam, Robert C. Murphy, Masahiro Nishijima, Christian R. H. Raetz, Takao Shimizu, Friedrich Spener, Gerrit van Meer, Michael J. O. Wakelam, et Edward A. Dennis. 2009. « Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids ». *Journal of Lipid Research* 50 (Suppl): S9-14. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800095-JLR200>.

Fairlamb, Alan H., et David Horn. 2018. « Melarsoprol Resistance in African Trypanosomiasis ». *Trends in Parasitology* 34 (6): 481-92. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.04.002>.

Ferguson, M. A., et G. A. Cross. 1984. « Myristylation of the Membrane Form of a *Trypanosoma Brucei* Variant Surface Glycoprotein ». *The Journal of Biological Chemistry* 259 (5): 3011-15.

Fickers, Patrick, Jacqueline Destain, et Philippe Thonart. 2008. « Les lipases sont des hydrolases atypiques : principales caractéristiques et applications ». *BASE*, janvier. <https://popups.uliege.be/443/1780-4507/index.php?id=2307>.

Franco, Jose R., Pere P. Simarro, Abdoulaye Diarra, et Jean G. Jannin. 2014. « Epidemiology of Human African Trypanosomiasis ». *Clinical Epidemiology*. 6 août 2014. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S39728>.

Frézil, Jean-Louis, Janick Lancien, A. Yebakima, Jean-Pierre Eouzan, P.Y. Ginoux, et Jean-Rigobert Malonga. 1981. « Epidémiologie de la trypanosomiase humaine en République Populaire du Congo : 3. Le foyer de Mbomo ». *Cahiers ORSTOM.Série Entomologie Médicale et Parasitologie* 19 (3): 187-98.

Geiger, Anne, Christophe Hirtz, Thierry Bécue, Eric Bellard, Delphine Centeno, Daniel Gargani, Michel Rossignol, Gérard Cuny, et Jean-Benoit Peltier. 2010. « Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma* ». *BMC Microbiology* 10 (janvier): 20. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-20>.

Genovese, Giulio, David J. Friedman, Michael D. Ross, Laurence Lecordier, Pierrick Uzureau, Barry I. Freedman, Donald W. Bowden, et al. 2010. « Association of Trypanolytic ApoL1 Variants with Kidney Disease in African Americans ». *Science* 329 (5993): 841-45. <https://doi.org/10.1126/science.1193032>.

Gibson, Wendy. 2015. « Liaisons Dangereuses: Sexual Recombination among Pathogenic Trypanosomes ». *Research in Microbiology* 166 (6): 459-66. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.05.005>.

GIORDANI, FEDERICA, LIAM J. MORRISON, TIM G. ROWAN, HARRY P. DE KONING, et MICHAEL P. BARRETT. 2016. « The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review ». *Parasitology* 143 (14): 1862-89. <https://doi.org/10.1017/S0031182016001268>.

Goodwin, L. 2008. « The African Scene: Mechanisms of Pathogenesis in Trypanosomiasis ». In *Trypanosomiasis and Leishmaniasis with Special Reference to Chagas' Disease*, 107-24. <https://doi.org/10.1002/9780470720035.ch6>.

Grébaut, Pascal, Paul Chuchana, Jean-Paul Brizard, Edith Demette, Martial Seveno, Géraldine Bossard, Patrick Jouin, et al. 2009. « Identification of Total and Differentially Expressed Excreted–Secreted Proteins from *Trypanosoma Congolense* Strains Exhibiting Different Virulence and Pathogenicity ». *International Journal for Parasitology* 39 (10): 1137-50. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.018>.

Guan, Xue Li, et Pascal Mäser. 2017. « Comparative Sphingolipidomics of Disease-Causing Trypanosomatids Reveal Unique Lifecycle- and Taxonomy-Specific Lipid Chemistries ». *Scientific Reports* 7 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13931-x>.

- Guegan, Fabien, Nicolas Plazolles, Théo Baltz, et Virginie Coustou. 2013. « Erythrophagocytosis of Desialylated Red Blood Cells Is Responsible for Anaemia during Trypanosoma Vivax Infection ». *Cellular Microbiology* 15 (8): 1285-1303. <https://doi.org/10.1111/cmi.12123>.
- Guidoni, A., F. Benkouka, J. De Caro, et M. Rovey. 1981. « Characterization of the serine reacting with diethyl p-nitrophenyl phosphate in porcine pancreatic lipase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* 660 (1): 148-50. [https://doi.org/10.1016/0005-2744\(81\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0005-2744(81)90120-0).
- Güther, Maria Lucia S., Michael D. Urbaniak, Amy Tavendale, Alan Prescott, et Michael A. J. Ferguson. 2014. « High-Confidence Glycosome Proteome for Procytic Form Trypanosoma Brucei by Epitope-Tag Organelle Enrichment and SILAC Proteomics ». *Journal of Proteome Research* 13 (6): 2796-2806. <https://doi.org/10.1021/pr401209w>.
- Haag, J. 1998. « The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 91 (1): 37-49. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00185-0](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00185-0).
- Haanstra, Jurgen R., Eglys B. González-Marcano, Melisa Gualdrón-López, et Paul A.M. Michels. 2016. « Biogenesis, Maintenance and Dynamics of Glycosomes in Trypanosomatid Parasites ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (5): 1038-48. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.015>.
- Hambrey, Peter N., Alan Mellors, et Ian R. Tizard. 1981. « The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic Trypanosoma species ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 2 (3): 177-86. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(81\)90098-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90098-0).
- Hanrahan, Orla, Helena Webb, Robert O'Byrne, Elaine Brabazon, Achim Treumann, Jack D. Sunter, Mark Carrington, et H. Paul Voorheis. 2009. « The Glycosylphosphatidylinositol-PLC in Trypanosoma Brucei Forms a Linear Array on the Exterior of the Flagellar Membrane before and after Activation ». *PLoS Pathogens* 5 (6): e1000468. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000468>.
- Heitz, Thierry. 2010. « Les multiples fonctions des protéines lipolytiques à domaine patatine ». *médecine/sciences* 26 (2): 128-30. <https://doi.org/10.1051/medsci/2010262128>.
- Hirano, Tohko, Mikiko Kishi, Hiroyuki Sugimoto, Ryo Taguchi, Hideru Obinata, Noriyasu Ohshima, Kazuaki Tatei, et Takashi Izumi. 2009. « Thioesterase Activity and Subcellular Localization of Acylprotein Thioesterase 1/Lysophospholipase 1 ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1791 (8): 797-805. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2009.05.001>.
- Hirumi, H., et K. Hirumi. 1989. « Continuous Cultivation of Trypanosoma Brucei Blood Stream Forms in a Medium Containing a Low Concentration of Serum Protein without Feeder Cell Layers ». *The Journal of Parasitology* 75 (6): 985-89.
- Hope-Rapp, E., O. Moussa Coulibaly, E. Klement, M. Danis, F. Bricaire, et E. Caumes. 2009. « Chancres cutanés révélant une trypanosomose africaine à Trypanosoma brucei gambiense chez un résident français au Gabon ». *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 136 (4): 341-45. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2008.09.023>.
- Jackson, Andrew P., Sophie Goyard, Dong Xia, Bernardo J. Foth, Mandy Sanders, Jonathan M. Wastling, Paola Minoprio, et Matthew Berriman. 2015. « Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of Trypanosoma vivax ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003975>.
- Jamonneau, Vincent, Hamidou Ilboudo, Jacques Kaboré, Dramane Kaba, Mathurin Koffi, Philippe Solano, André Garcia, et al. 2012. « Untreated Human Infections by Trypanosoma Brucei Gambiense Are Not 100% Fatal ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (6): e1691. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001691>.
- Jamonneau, Vincent, Philippe Truc, Pascal Grébaud, Stéphane Herder, Sophie Ravel, Philippe Solano, et Thierry De Meeus. 2019. « Trypanosoma Brucei Gambiense Group 2: The Unusual Suspect ». *Trends in Parasitology* 35 (12): 983-95. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.09.002>.
- Kato, Charles D., Ann Nanteza, Claire Mugasa, Andrew Edyelu, Enock Matovu, et Vincent P. Alibu. 2015. « Clinical Profiles, Disease Outcome and Co-Morbidities among T. b. Rhodesiense Sleeping Sickness Patients in Uganda ». *PLoS One* 10 (2): e0118370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118370>.
- Kay, Chris, Lori Peacock, et Wendy Gibson. 2019. « Trypanosoma Congolense: In Vitro Culture and

- Transfection ». *Current Protocols in Microbiology* 53 (1): e77. <https://doi.org/10.1002/cpmc.77>.
- Kennedy, Peter G. E., et Jean Rodgers. 2019. « Clinical and Neuropathogenetic Aspects of Human African Trypanosomiasis ». *Frontiers in Immunology* 10: 39. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00039>.
- Kennedy, Peter Ge. 2013. « Clinical Features, Diagnosis, and Treatment of Human African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness) ». *The Lancet. Neurology* 12 (2): 186-94. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X).
- Khan, Faez Iqbal, Dongming Lan, Rabia Durrani, Weiqian Huan, Zexin Zhao, et Yonghua Wang. 2017. « The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of Enzymatic Properties ». *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 5 (mars). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016>.
- Kim, Kyeong Kyu, Hyun Kyu Song, Dong Hae Shin, Kwang Yeon Hwang, Senyon Choe, Ook Joon Yoo, et Se Won Suh. 1997. « Crystal Structure of Carboxylesterase from *Pseudomonas Fluorescens*, an α/β Hydrolase with Broad Substrate Specificity ». *Structure* 5 (12): 1571-84. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(97\)00306-7](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(97)00306-7).
- King-Keller, Sharon, Christina A. Moore, Roberto Docampo, et Silvia N. J. Moreno. 2015. « Ca²⁺ Regulation of *Trypanosoma brucei* Phosphoinositide Phospholipase C ». *Eukaryotic Cell* 14 (5): 486-94. <https://doi.org/10.1128/EC.00019-15>.
- Kingma, Roelie L., et Maarten R. Egmond. 2002. « Activation of a Covalent Outer Membrane Phospholipase A Dimer ». *European Journal of Biochemistry* 269 (8): 2178-85. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02873.x>.
- Kobayashi, J., K. Shirai, Y. Saito, et S. Yoshida. 1989. « Lipoprotein Lipase with a Defect in Lipid Interface Recognition in a Case with Type I Hyperlipidaemia ». *European Journal of Clinical Investigation* 19 (5): 424-32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1989.tb00254.x>.
- Kocher, Arthur. 2013. « La trypanosomose à *Trypanosoma evansi* chez les chevaux en Thaïlande : enquête épidémiologique et standardisation d'un test ELISA indirect ». Other. <https://oatao.univ-toulouse.fr/8827/>.
- Kokotou, Maroula G., Gerasimia Galiatsatou, Victoria Magrioti, Giorgos Koutoulogenis, Efrosini Barbayianni, Dimitris Limnios, Varnavas D. Mouchlis, et al. 2017. « 2-Oxoesters: A Novel Class of Potent and Selective Inhibitors of Cytosolic Group IVA Phospholipase A2 ». *Scientific Reports* 7 (1): 7025. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07330-5>.
- Kudo, Ichiro, et Makoto Murakami. 2002. « Phospholipase A2 enzymes ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators, Molecular Biology of the Arachidonate Cascade*, 68-69 (août): 3-58. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00020-5).
- Lachenal. 2014. *Le médicament qui devait sauver l'Afrique*. https://editions-ladecouverte.fr/catalogue/index-Le_m_dicament_qui_devait_sauver_l_Afrique-9782359250879.html.
- Laemmli, U. K. 1970. « Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 ». *Nature* 227 (5259): 680-85. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Lambrecht, Frank L. 1985. « Trypanosomes and Hominid Evolution ». *BioScience* 35 (10): 640-46. <https://doi.org/10.2307/1309990>.
- Laveissière, Claude, Pascal Grébaud, Stéphane Herder, et Laurent Penchenier. s. d. « Les glossines vectrices de la maladie du sommeil », 257.
- Liu, Panpan, Wu Zhu, Chao Chen, Bei Yan, Lei Zhu, Xiang Chen, et Cong Peng. 2020. « The Mechanisms of Lysophosphatidylcholine in the Development of Diseases ». *Life Sciences* 247 (avril): 117443. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117443>.
- Longdet, Ishaya Y., Hajiya M. Inuwa, Isma'ïl A. Umar, et Andrew J. Nok. 2015. « Sequence Homology Studies of Phospholipase A2-like Gene from Bloodstream Form of *Trypanosoma Brucei* ». *Biotechnology Journal International*, 156-65. <https://doi.org/10.9734/BBJ/2015/13971>.
- Longdet, Ishaya, Bitrus Yakubu, Inuwa Mairo, Isma'ila Umar, et Andrew Nok. 2016. « Immunostimulative Action of *Trypanosoma brucei* Phospholipase A2 Gene Containing CpG Motifs Confers Homologous Protection against Infection in Experimental Mice ». *Asian Journal of Medicine and Health* 1 (janvier): 1-10. <https://doi.org/10.9734/AJMAH/2016/30065>.

- Love, Sandy, et Tim S. Mair. 2012. « Infectious Diseases and Parasitology ». In *Equine Medicine, Surgery and Reproduction*, 399-422. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-2801-4.00019-5>.
- Luján, H. D., et D. H. Bronia. 1994. « Intermembrane Lipid Transfer during Trypanosoma Cruzi-Induced Erythrocyte Membrane Destabilization ». *Parasitology* 108 (Pt 3) (avril): 323-34. <https://doi.org/10.1017/s0031182000076162>.
- Mandal, P, A Gupta, W Fusi-Rubiano, P A Keane, et Y Yang. 2017. « Fingolimod: therapeutic mechanisms and ocular adverse effects ». *Eye* 31 (2): 232-40. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.258>.
- Masocha, Willias, et Krister Kristensson. 2012. « Passage of parasites across the blood-brain barrier ». *Virulence* 3 (2): 202-12. <https://doi.org/10.4161/viru.19178>.
- Masterson, W. J., J. Raper, T. L. Doering, G. W. Hart, et P. T. Englund. 1990. « Fatty Acid Remodeling: A Novel Reaction Sequence in the Biosynthesis of Trypanosome Glycosyl Phosphatidylinositol Membrane Anchors ». *Cell* 62 (1): 73-80. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90241-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90241-6).
- Matloubian, Mehrdad, Charles G. Lo, Guy Cinamon, Matthew J. Lesneski, Ying Xu, Volker Brinkmann, Maria L. Allende, Richard L. Proia, et Jason G. Cyster. 2004. « Lymphocyte Egress from Thymus and Peripheral Lymphoid Organs Is Dependent on S1P Receptor 1 ». *Nature* 427 (6972): 355-60. <https://doi.org/10.1038/nature02284>.
- Mekonnen, Yonatan Ayalew, Mehmet Gültas, Kefena Effa, Olivier Hanotte, et Armin O. Schmitt. 2019. « Identification of Candidate Signature Genes and Key Regulators Associated With Trypanotolerance in the Sheko Breed ». *Frontiers in Genetics* 10: 1095. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01095>.
- Mellors, A., et A. Samad. 1989. « The Acquisition of Lipids by African Trypanosomes ». *Parasitology Today (Personal Ed.)* 5 (8): 239-44. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90255-x](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90255-x).
- Mesquita, Rafael D., Alan Brito Carneiro, André Bafica, Felipe Gazos-Lopes, Christina M. Takiya, Thaís Souto-Padron, Danielle P. Vieira, et al. 2008. « Trypanosoma cruzi Infection Is Enhanced by Vector Saliva through Immunosuppressant Mechanisms Mediated by Lysophosphatidylcholine ». *Infection and Immunity* 76 (12): 5543-52. <https://doi.org/10.1128/IAI.00683-08>.
- Misra, K. K., S. Roy, et A. Choudhury. 2016. « Biology of Trypanosoma (Trypanozoon) Evansi in Experimental Heterologous Mammalian Hosts ». *Journal of Parasitic Diseases: Official Organ of the Indian Society for Parasitology* 40 (3): 1047-61. <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0633-1>.
- Moreno, Cláudia Jassica Gonçalves, Adriana Temporão, Taffarel Torres, et Marcelo Sousa Silva. 2019. « Trypanosoma Brucei Interaction with Host: Mechanism of VSG Release as Target for Drug Discovery for African Trypanosomiasis ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061484>.
- Moreno, Cláudia Jassica Gonçalves, Taffarel Torres, et Marcelo Sousa Silva. 2019. « Variable Surface Glycoprotein from Trypanosoma Brucei Undergoes Cleavage by Matrix Metalloproteinases: An in Silico Approach ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 8 (4). <https://doi.org/10.3390/pathogens8040178>.
- Mugnier, M. R., G. A. M. Cross, et F. N. Papavasiliou. 2015. « The in Vivo Dynamics of Antigenic Variation in Trypanosoma Brucei ». *Science* 347 (6229): 1470-73. <https://doi.org/10.1126/science.aaa4502>.
- Muhammad, Khalid. 2009. *Identification and Characterization of Phospholipase A2 from Trypanosoma Brucei*.
- Naessens, J. 2006. « Bovine Trypanotolerance: A Natural Ability to Prevent Severe Anaemia and Haemophagocytic Syndrome? ». *International Journal for Parasitology* 36 (5): 521-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.012>.
- Nardini, Marco, et Bauke W Dijkstra. 1999. « α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing ». *Current Opinion in Structural Biology* 9 (6): 732-37. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(99\)00037-8](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(99)00037-8).
- Nikolskaia, Olga V., Yuri V. Kim, Olga Kovbasnjuk, Kee Jun Kim, et Dennis J. Grab. 2006. « Entry of Trypanosoma Brucei Gambiense into Microvascular Endothelial Cells of the Human Blood-Brain Barrier ». *International Journal for Parasitology, Blood-brain Barrier in Parasitic Disease*, 36 (5): 513-19. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.01.011>.
- Odeniran, Paul Olalekan, Isaiah Oluwafemi Ademola, Ewan Thomas Macleod, et Susan Christina Welburn. 2018. « Bovine and Small Ruminant African Animal Trypanosomiasis in Nigeria - A Review ». *Veterinary Parasitology, Regional Studies and Reports* 13: 5-13. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.03.001>.

- Ollivier, Gaelle, et Dominique Legros. 2001. « Trypanosomiase Humaine Africaine: Historique de La Therapeutique et de Ses Echecs ». *Tropical Medicine and International Health* 6 (11): 855-63. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00753.x>.
- Ooi, Cher-Pheng, Sarah Schuster, Christelle Cren-Travaillé, Eloise Bertiaux, Alain Cosson, Sophie Goyard, Sylvie Perrot, et Brice Rotureau. 2016. « The Cyclical Development of Trypanosoma vivax in the Tsetse Fly Involves an Asymmetric Division ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00115>.
- Opperdoes, F. R., et J. van Roy. 1982. « The Phospholipases of Trypanosoma Brucei Bloodstream Forms and Cultured Procyclics ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 5 (5): 309-19. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(82\)90038-x](https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90038-x).
- Ormerod, W. E., et S. Venkatesan. 1971. « An Amastigote Phase of the Sleeping Sickness Trypanosome ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 65 (6): 736-41. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(71\)90088-5](https://doi.org/10.1016/0035-9203(71)90088-5).
- Pankhaniya, Ravi R., Miki Tamura, Leonard R. Allmond, Kiyoshi Moriyama, Temitayo Ajayi, Jeanine P. Wiener-Kronish, et Teiji Sawa. 2004. « Pseudomonas Aeruginosa Causes Acute Lung Injury via the Catalytic Activity of the Patatin-like Phospholipase Domain of ExoU* ». *Critical Care Medicine* 32 (11): 2293-99. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000145588.79063.07>.
- Pays, Etienne, Benoit Vanhollenbeke, Pierrick Uzureau, Laurence Lecordier, et David Pérez-Morga. 2014. « The Molecular Arms Race between African Trypanosomes and Humans ». *Nature Reviews. Microbiology* 12 (8): 575-84. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3298>.
- Pays, Etienne, Benoit Vanhollenbeke, Luc Vanhamme, Françoise Paturiaux-Hanocq, Derek P. Nolan, et David Pérez-Morga. 2006. « The Trypanolytic Factor of Human Serum ». *Nature Reviews Microbiology* 4 (6): 477-86. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1428>.
- Peacock, Lori, Vanessa Ferris, Reuben Sharma, Jack Sunter, Mick Bailey, Mark Carrington, et Wendy Gibson. 2011. « Identification of the Meiotic Life Cycle Stage of Trypanosoma Brucei in the Tsetse Fly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (9): 3671-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019423108>.
- Pérez, Dolores, Filip Kovacic, Susanne Wilhelm, Karl-Erich Jaeger, María Teresa García, Antonio Ventosa, et Encarnación Mellado. 2012. « Identification of Amino Acids Involved in the Hydrolytic Activity of Lipase LipBL from Marinobacter Lipolyticus ». *Microbiology (Reading, England)* 158 (Pt 8): 2192-2203. <https://doi.org/10.1099/mic.0.058792-0>.
- Perez-Morga, D. 2005. « Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes ». *Science* 309 (5733): 469-72. <https://doi.org/10.1126/science.1114566>.
- Plemel, Jason R., Nathan J. Michaels, Nina Weishaupt, Andrew V. Caprariello, Michael B. Keough, James A. Rogers, Aran Yukseloglu, et al. 2018. « Mechanisms of Lysophosphatidylcholine-Induced Demyelination: A Primary Lipid Disrupting Myelinopathy ». *Glia* 66 (2): 327-47. <https://doi.org/10.1002/glia.23245>.
- Plonski, Noel-Marie, Bianca Bissoni, Madara Hetti Arachchilage, Karl Romstedt, Edgar E. Kooijman, et Helen Piontkivska. 2018. « Shedding Light on Lipid Metabolism in Kinetoplastida: A Phylogenetic Analysis of Phospholipase D Protein Homologs ». *Gene* 656 (mai): 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.063>.
- Proto, William R., Esther Castanys-Munoz, Alana Black, Laurence Tetley, Catherine X. Moss, Luiz Juliano, Graham H. Coombs, et Jeremy C. Mottram. 2011. « Trypanosoma Brucei Metacaspase 4 Is a Pseudopeptidase and a Virulence Factor ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (46): 39914-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.292334>.
- Richmond, Gregory S., et Terry K. Smith. 2007a. « A novel phospholipase from Trypanosoma brucei ». *Molecular microbiology* 63 (4): 1078-95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05582.x>.
- . 2011. « Phospholipases A1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 12 (1): 588-612. <https://doi.org/10.3390/ijms12010588>.
- Richmond, Gregory S., et Terry K. Smith. 2007b. « The role and characterization of phospholipase A1 in mediating lysophosphatidylcholine synthesis in Trypanosoma brucei ». *Biochemical Journal* 405 (Pt 2): 319-29. <https://doi.org/10.1042/BJ20070193>.
- Rico, Eva, Federico Rojas, Binny M. Mony, Balazs Szoor, Paula MacGregor, et Keith Roland Matthews. 2013.

- « Bloodstream Form Pre-Adaptation to the Tsetse Fly in *Trypanosoma Brucei* ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00078>.
- Ricossa et al. 1973. « La prophylaxie de la trypanosomiase humaine africaine ». *Médecine d'Afrique Noire*.
- Ridgley, Evelyn L, et Larry Ruben. 2001. « Phospholipase from *Trypanosoma Brucei* Releases Arachidonic Acid by Sequential Sn-1, Sn-2 Deacylation of Phospholipids ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 114 (1): 29-40. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00234-1](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00234-1).
- Rifkin, M R. 1978. « Identification of the trypanocidal factor in normal human serum: high density lipoprotein. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (7): 3450-54.
- Roberts, C. J., I. R. Tizard, A. Mellors, et M. J. Clarkson. 1977. « Lysophospholipases, Lipid Metabolism, and the Pathogenesis of African Trypanosomiasis ». *Lancet (London, England)* 2 (8049): 1187-88. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)91589-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)91589-6).
- Roberts, L. W., B. T. Wellde, M. J. Reardon, et F. K. Onyango. 1989. « Mechanical Transmission of *Trypanosoma Brucei* Rhodesiense by *Glossina Morsitans Morsitans* (Diptera:Glossinidae) ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 83 Suppl 1 (août): 127-31. <https://doi.org/10.1080/00034983.1989.11812417>.
- Rocha, G., A. Martins, G. Gama, F. Brandão, et J. Atouguia. 2004. « Possible Cases of Sexual and Congenital Transmission of Sleeping Sickness ». *Lancet (London, England)* 363 (9404): 247. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)15345-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)15345-7).
- Roitel, Olivier. s. d. « Rôle de la structure quaternaire de la Glyceraldéhyde 3-phosphate Déshydrogénase (GAPDH) phosphorylante de *Bacillus stearothermophilus* dans la révélation de l'activité enzymatique et les propriétés de coopérativité de fixation du cofacteur », 197.
- Rojas, Federico, Eleanor Silvester, Julie Young, Rachel Milne, Mabel Tettey, Douglas R. Houston, Malcolm D. Walkinshaw, et al. 2019. « Oligopeptide Signaling through TbGPR89 Drives Trypanosome Quorum Sensing ». *Cell* 176 (1): 306-317.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.041>.
- Roy, Ambrish, Alper Kucukural, et Yang Zhang. 2010. « I-TASSER: A Unified Platform for Automated Protein Structure and Function Prediction ». *Nature Protocols* 5 (4): 725-38. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>.
- Rutto, Jane Jemeli, Odipo Osano, Elias Gitonga Thurairira, Richard Kiptum Kurgat, et Victor Agab Omondi Odenyo. 2013. « Socio-Economic and Cultural Determinants of Human African Trypanosomiasis at the Kenya - Uganda Transboundary ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002186>.
- Sacchettini, J. C., J. I. Gordon, et L. J. Banaszak. 1988. « The Structure of Crystalline *Escherichia Coli*-Derived Rat Intestinal Fatty Acid-Binding Protein at 2.5-Å Resolution. » *Journal of Biological Chemistry* 263 (12): 5815-19.
- Sage, L., P. N. Hambrey, G. M. Werchola, A. Mellors, et I. R. Tizard. 1981. « Lysophospholipase 1 in *Trypanosoma Brucei* ». *Tropenmedizin Und Parasitologie* 32 (4): 215-20.
- Sato, Hiromi, et Dara W. Frank. 2004. « ExoU Is a Potent Intracellular Phospholipase ». *Molecular Microbiology* 53 (5): 1279-90. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04194.x>.
- Schmiel, D. H., E. Wagar, L. Karamanou, D. Weeks, et V. L. Miller. 1998. « Phospholipase A of *Yersinia Enterocolitica* Contributes to Pathogenesis in a Mouse Model ». *Infection and Immunity* 66 (8): 3941-51. <https://doi.org/10.1128/IAI.66.8.3941-3951.1998>.
- Seeliger, H. P. R., et L. Seefried. 1989. « Aldo Castellani — an Appraisal of His Life and Oeuvre Aldo Castellani — Sein Leben Und Sein Werk ». *Mycoses* 32 (8): 391-97. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1989.tb02269.x>.
- Sevastou, Ioanna, Eleanna Kaffe, Marios-Angelos Mouratis, et Vassilis Aidinis. 2013. « Lysoglycerophospholipids in Chronic Inflammatory Disorders: The PLA(2)/LPC and ATX/LPA Axes ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1831 (1): 42-60. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2012.07.019>.
- Shugaba, A., I. Umar, J. Omaye, N. D. Ibrahim, J. Andrews, A. I. Ukoha, D. I. Saror, et K. A. Esievo. 1994. « Biochemical Differences (O-Acetyl and Glycolyl Groups) in Erythrocyte Surface Sialic Acids of Trypanotolerant N'dama and Trypanosusceptible Zebu Cattle ». *Journal of Comparative Pathology* 110 (1):

91-95. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(08\)80273-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(08)80273-3).

Smith, Terry K., Frédéric Bringaud, Derek P. Nolan, et Luisa M. Figueiredo. 2017. « Metabolic reprogramming during the *Trypanosoma brucei* life cycle ». *F1000Research* 6 (mai). <https://doi.org/10.12688/f1000research.10342.2>.

Smith, Terry K., et Peter Bütikofer. 2010. « Lipid metabolism in *Trypanosoma brucei* ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 172 (2): 66-79. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.04.001>.

Sollelis, Lauriane, et Matthias Marti. 2019. « A Major Step towards Defining the Elusive Stumpy Inducing Factor in *Trypanosoma Brucei* ». *Trends in Parasitology* 35 (1): 6-8. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2018.11.009>.

Sternberg, Jeremy M., Jean Rodgers, Barbara Bradley, Lorna Maclean, Max Murray, et Peter G. E. Kennedy. 2005. « Meningoencephalitic African Trypanosomiasis: Brain IL-10 and IL-6 Are Associated with Protection from Neuro-Inflammatory Pathology ». *Journal of Neuroimmunology* 167 (1-2): 81-89. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.06.017>.

Steverding, Dietmar. 2008. « The history of African trypanosomiasis ». *Parasites & Vectors* 1 (février): 3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-3>.

Stijlemans, Benoit, Jennifer Cnops, Peter Naniima, Axel Vaast, Viki Bockstal, Patrick De Baetselier, et Stefan Magez. 2015. « Development of a pHrodo-Based Assay for the Assessment of In Vitro and In Vivo Erythrophagocytosis during Experimental Trypanosomiasis ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 9 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003561>.

Stijlemans, Benoit, Patrick De Baetselier, Stefan Magez, Jo A. Van Genderachter, et Carl De Trez. 2018. « African Trypanosomiasis-Associated Anemia: The Contribution of the Interplay between Parasites and the Mononuclear Phagocyte System ». *Frontiers in Immunology* 9 (février). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00218>.

Sunter, Jack D. 2016. « A Vanillic Acid Inducible Expression System for *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 207 (1): 45-48. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2016.04.001>.

Szempruch, Anthony J., Steven E. Sykes, Rudo Kieft, Lauren Denison, Allison C. Becker, Anzio Gartrell, William J. Martin, et al. 2016. « Extracellular vesicles from *Trypanosoma brucei* mediate virulence factor transfer and cause host anemia ». *Cell* 164 (0): 246-57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.051>.

Taylor, Jesse, et Gloria Rudenko. 2006. « Switching trypanosome coats: What's in the wardrobe? » *Trends in genetics : TIG* 22 (décembre): 614-20. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.08.003>.

Teixeira, Dirceu E., Marlene Benchimol, Paulo Henrique Crepaldi, et Wanderley de Souza. 2012. « Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>.

Thomson, Russell, Giulio Genovese, Chelsea Canon, Daniella Kovacsics, Matthew K. Higgins, Mark Carrington, Cheryl A. Winkler, et al. 2014. « Evolution of the primate trypanolytic factor APOL1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (20): E2130-39. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400699111>.

Thomson, Russell, Pilar Molina-Portela, Helen Mott, Mark Carrington, et Jayne Raper. 2009. « Hydrodynamic Gene Delivery of Baboon Trypanosome Lytic Factor Eliminates Both Animal and Human-Infective African Trypanosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (46): 19509-14. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905669106>.

Tiberti, Natalia, Alexandre Hainard, Veerle Lejon, Bertrand Courtioux, Enock Matovu, John Charles Enyaru, Xavier Robin, et al. 2012. « Cerebrospinal Fluid Neopterin as Marker of the Meningo-Encephalitic Stage of *Trypanosoma Brucei* Gambiense Sleeping Sickness ». *PLOS ONE* 7 (7): e40909. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040909>.

Tinti, Michele, Maria Lucia S. Güther, Thomas W. M. Crozier, Angus I. Lamond, et Michael A. J. Ferguson. 2019. « Proteome Turnover in the Bloodstream and Procyclic Forms of *Trypanosoma Brucei* Measured by Quantitative Proteomics ». *Wellcome Open Research* 4 (octobre): 152. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15421.1>.

Tizard, I. R., A. Mellors, W. L. Holmes, et K. Nielsen. 1978. « The Generation of Phospholipase A and Hemolytic Fatty Acids by Autolysing Suspensions of *Trypanosoma Congolense* ». *Tropenmedizin Und Parasitologie* 29 (1): 127-33.

- Tizard, I. R., K. Nielsen, A. Mellors, et R. K. Assoku. 1977. « Free Fatty Acids, Lysophospholipases, and the Pathogenesis of African Trypanosomiasis ». *Lancet (London, England)* 2 (8028): 91. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(77\)90097-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(77)90097-6).
- Tjoelker, Larry W., Chris Eberhardt, Jeff Unger, Hai Le Trong, Guy A. Zimmerman, Thomas M. McIntyre, Diana M. Stafforini, Stephen M. Prescott, et Patrick W. Gray. 1995. « Plasma Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Is a Secreted Phospholipase A2 with a Catalytic Triad ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (43): 25481-87. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.43.25481>.
- Tomlinson, S., A. M. Jansen, A. Koudinov, J. A. Ghiso, N. H. Choi-Miura, M. R. Rifkin, S. Ohtaki, et V. Nussenzweig. 1995. « High-Density-Lipoprotein-Independent Killing of Trypanosoma Brucei by Human Serum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 70 (1-2): 131-38. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(95\)00019-w](https://doi.org/10.1016/0166-6851(95)00019-w).
- Torrele, Els, Bernadette Bourdin Trunz, David Tweats, Marcel Kaiser, Reto Brun, Guy Mazué, Michael A. Bray, et Bernard Pécou. 2010. « Fexinidazole – A New Oral Nitroimidazole Drug Candidate Entering Clinical Development for the Treatment of Sleeping Sickness ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923>.
- Truc, Philippe. s. d. « Apport de la génétique des populations à la taxonomie de Trypanosoma brucei et à l'épidémiologie de la trypanosomiase humaine en Afrique centrale », 134.
- Trypanosomiase Humaine Africaine Lutte Et Surveillance*. 2015. World Health Organization.
- Urech, Karin, Andreas Neumayr, et Johannes Blum. 2011. « Sleeping Sickness in Travelers - Do They Really Sleep? » *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (11): e1358. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001358>.
- Uzureau, Pierrick, Sophie Uzureau, Laurence Lecordier, Frédéric Fontaine, Patricia Tebabi, Fabrice Homblé, Axelle Grélard, et al. 2013. « Mechanism of Trypanosoma Brucei Gambiense Resistance to Human Serum ». *Nature* 501 (7467): 430-34. <https://doi.org/10.1038/nature12516>.
- Van Xong, Hoang, Luc Vanhamme, Mustapha Chamekh, Chibeka Evelyn Chimfwembe, Jan Van Den Abbeele, Annette Pays, Nestor Van Meirvenne, Raymond Hamers, Patrick De Baetselier, et Etienne Pays. 1998. « A VSG Expression Site-Associated Gene Confers Resistance to Human Serum in Trypanosoma Rhodesiense ». *Cell* 95 (6): 839-46. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81706-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81706-7).
- Vincendeau, Philippe, et Bernard Bouteille. 2006. « Immunology and Immunopathology of African Trypanosomiasis ». *Anais Da Academia Brasileira de Ciências* 78 (4): 645-65. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652006000400004>.
- Vink, Cornelis, Gloria Rudenko, et H. Steven Seifert. 2012. « Microbial antigenic variation mediated by homologous DNA recombination ». *FEMS microbiology reviews* 36 (5): 917-48. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00321.x>.
- Vreysen, M. J., K. M. Saleh, M. Y. Ali, A. M. Abdulla, Z. R. Zhu, K. G. Juma, V. A. Dyck, A. R. Msangi, P. A. Mkonyi, et H. U. Feldmann. 2000. « Glossina Austeni (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique ». *Journal of Economic Entomology* 93 (1): 123-35. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-93.1.123>.
- Wang, A., C. A. Johnson, Y. Jones, M. H. Ellisman, et E. A. Dennis. 2000. « Subcellular Localization and PKC-Dependent Regulation of the Human Lysophospholipase A/Acyl-Protein Thioesterase in WISH Cells ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1484 (2-3): 207-14. [https://doi.org/10.1016/s1388-1981\(00\)00020-2](https://doi.org/10.1016/s1388-1981(00)00020-2).
- Wang, Aijun, Raymond A. Deems, et Edward A. Dennis. 1997. « Cloning, Expression, and Catalytic Mechanism of Murine Lysophospholipase I ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (19): 12723-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.19.12723>.
- Wang, Aijun, Hsiu-Chiung Yang, Peter Friedman, ChristinaA. Johnson, et EdwardA. Dennis. 1999. « A Specific Human Lysophospholipase: CDNA Cloning, Tissue Distribution and Kinetic Characterization ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1437 (2): 157-69. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00012-8](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00012-8).
- Webster, P., et D. G. Russell. 1993. « The Flagellar Pocket of Trypanosomatids ». *Parasitology Today* 9 (6): 201-6. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90008-4](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90008-4).
- Welburn, S. C., et I. Maudlin. 1992. « The Nature of the Teneral State in Glossina and Its Role in the Acquisition of Trypanosome Infection in Tsetse ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 86 (5): 529-36. <https://doi.org/10.1080/00034983.1992.11812703>.

- Wheeler, Richard J. 2010. « The Trypanolytic Factor-Mechanism, Impacts and Applications ». *Trends in Parasitology* 26 (9): 457-64. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.05.005>.
- Wilson, Sarah K., et Laura J. Knoll. 2018. « Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa ». *Molecular microbiology* 107 (1): 34-46. <https://doi.org/10.1111/mmi.13871>.
- Wirtz, E., S. Leal, C. Ochatt, et G. A. Cross. 1999. « A Tightly Regulated Inducible Expression System for Conditional Gene Knock-Outs and Dominant-Negative Genetics in Trypanosoma Brucei ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 99 (1): 89-101. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)00002-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00002-x).
- Wong, H, R C Davis, J Nikazy, K E Seebart, et M C Schotz. 1991a. « Domain exchange: characterization of a chimeric lipase of hepatic lipase and lipoprotein lipase. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24): 11290-94.
- Wong, Howard, et Michael C. Schotz. 2002. « The Lipase Gene Family ». *Journal of Lipid Research* 43 (7): 993-99. <https://doi.org/10.1194/jlr.R200007-JLR200>.
- Yang, Jianyi, et Yang Zhang. 2015. « I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions ». *Nucleic Acids Research* 43 (Web Server issue): W174-81. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv342>.
- Yaro, M., K. A. Munyard, M. J. Stear, et D. M. Groth. 2016. « Combatting African Animal Trypanosomiasis (AAT) in Livestock: The Potential Role of Trypanotolerance ». *Veterinary Parasitology* 225 (juillet): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.05.003>.
- Zallot, Rémi. 2011. « Identification et caractérisation d'une lipase exprimée pendant l'hydrolyse des réserves chez Arabidopsis thaliana ». Thesis, Bordeaux 2. <http://www.theses.fr/2011BOR21840>.