



HAL
open science

Caractérisation d'une phospholipase patatin-like impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez *Trypanosoma brucei*

Perrine Hervé

► **To cite this version:**

Perrine Hervé. Caractérisation d'une phospholipase patatin-like impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez *Trypanosoma brucei*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0378 . tel-04850972

HAL Id: tel-04850972

<https://theses.hal.science/tel-04850972v1>

Submitted on 20 Dec 2024

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

**DOCTEURE DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

École doctorale : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Microbiologie – Immunologie

Par **Perrine HERVÉ**

**Caractérisation d'une phospholipase *patatin-like*
impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques
chez *Trypanosoma brucei***

Sous la direction du **Professeur Loïc RIVIÈRE**

Soutenue le 6 Décembre 2024

Membres du jury :

Dr. Catherine JACKSON	Directrice de Recherche, Université Paris Cité	Rapporteure
Pr. Rachel CERDAN	Professeure des Universités, Université de Montpellier	Rapporteure
Dr. Maude LEVEQUE	Maître de Conférences - PH, Université de Montpellier	Examinatrice
Dr. Sébastien MONGRAND	Directeur de Recherche, Université de Bordeaux	Président
Pr. Loïc RIVIÈRE	Professeur des Universités, Université de Bordeaux	Directeur

Résumé

Titre : Caractérisation d'une phospholipase *patatin-like* impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez *Trypanosoma brucei*.

Les trypanosomes africains sont des parasites protozoaires flagellés responsables de maladies mortelles chez l'Homme (Trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil) et les animaux (Trypanosomiase animale africaine ou Nagana). *Trypanosoma brucei* représente l'organisme modèle de l'étude de ces pathogènes. Ce parasite alterne entre un hôte mammifère et un insecte diptère hématophage assurant la transmission vectorielle, la mouche tsétsé, retrouvée uniquement en Afrique Subsaharienne. Lors de cette évolution cyclique, le pathogène doit traverser différents tissus (peau, sang et tissu lymphatique, tissu adipeux chez les mammifères ; tractus digestif, glandes salivaires chez l'insecte), et montre ainsi de grandes capacités d'adaptations à ces différents milieux. Pour pouvoir compléter ce cycle et s'adapter à ses différents hôtes, *T. brucei* est capable de modifier rapidement sa morphologie et son métabolisme. Dans ces conditions, la mobilisation et l'utilisation de lipides est particulièrement essentielle à la survie de ces parasites. Ces molécules entrent dans de nombreux processus cellulaires très variés, incluant le maintien et le renouvellement des membranes cellulaires (constituées de phospholipides), le métabolisme énergétique, les voies de signalisation cellulaire et la régulation de l'expression des gènes. Une telle mobilisation dans les cellules est permise grâce à un compartiment hautement dynamique appelé gouttelettes lipidiques. Cet organite atypique entouré d'une monocouche de phospholipides forme une plateforme métabolique cellulaire et représente un intérêt grandissant chez l'Homme par ses rôles potentiels dans les maladies métaboliques et neurodégénératives ou les cancers. Chez les parasites protozoaires, l'étude très récente de ces organites montre des rôles dans la survie et la virulence chez l'hôte mammifère.

Le projet de cette thèse visait à identifier et caractériser de nouvelles protéines liées aux gouttelettes lipidiques de *T. brucei* pour comprendre leur fonction chez le parasite. Nous avons découvert une nouvelle phospholipase dite *patatin-like* que nous avons appelé TbPat.

Nous avons montré par différentes techniques d'imagerie que TbPat est retrouvée à la surface des gouttelettes lipidiques du parasite. L'expression de cette protéine est fortement régulée par le parasite et répond notamment à des signaux de formation de nouvelles gouttelettes lipidiques, comme l'oléate, montrant l'implication de cette protéine dans la dynamique du compartiment. La délétion de la protéine impacte significativement la taille et le nombre de gouttelettes chez les parasites, associé à un remodelage de leurs profils lipidique et protéomique. Enfin, des expériences de mutagénèse dirigée ont permis de démontrer que TbPat est une enzyme dont l'activité dépend d'une sérine canonique des lipases.

Ce projet a permis de caractériser la première phospholipase impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez les trypanosomes, et ouvre la voie vers de nouvelles études pour élucider les fonctions de cet organite non seulement chez les parasites protozoaires mais aussi dans d'autres types de cellules eucaryotes d'organismes plus complexes.

Mots clés : *Trypanosoma brucei*, gouttelettes lipidiques, phospholipase, patatine, métabolisme, lipides.

Abstract

Titre : Characterization of a patatin-like phospholipase involved in lipid droplet biology in *Trypanosoma brucei*

African trypanosomes are flagellated protozoan parasites responsible for deadly diseases in humans (Human African trypanosomiasis or sleeping sickness) and animals (Animal African trypanosomiasis or Nagana). *Trypanosoma brucei* is the study model for these pathogens. This parasite alternates between a mammal host and a bloodsucking insect that allows vectorial transmission, the tsetse fly, found in Sub-Saharan Africa. During this lifecycle, the pathogen must cross several tissues (skin, bloodstream, lymph and adipose tissue in the mammal; midgut and salivary glands in the insect), and shows great capacities of adaptation in these different environments. To complete this cycle and adapt to its hosts, *T. brucei* is able to quickly modify its morphology and metabolism. In this context, the mobilization and utilization of lipids is particularly essential to the parasite's survival. These molecules are involved in various cellular processes, including the maintenance and renewal of cellular membranes (made of phospholipids), energy metabolism, cellular signaling pathways and gene expression regulation. This mobilization is made possible by a highly dynamic compartment called lipid droplets. This atypical organelle, surrounded by a monolayer of phospholipids, forms a metabolic platform and represents a growing interest in human health due to its potential roles in metabolic and neurodegenerative diseases, as well as cancers. In protozoan parasites, the very recent interest in lipid droplets shows roles in the survival and virulence in the mammal host.

The objective of this thesis was to identify and characterize new proteins associated with the lipid droplets of *T. brucei* to understand the organelle's function in the parasite. We discovered a new phospholipase of the *patatin-like* family, which we called TbPat. We showed through different imaging techniques that TbPat localizes to the surface of the lipid droplets of the parasite. The expression of this protein is tightly regulated and can be induced during the formation of new lipid droplets, demonstrating the implication of this protein in the dynamics of the compartment. Deletion of the protein significantly impacts the diameter and number of lipid droplets in the parasites, associated with a complete remodeling of their lipid and proteomic profiles.

Finally, directed mutagenesis showed that TbPat is an enzyme with an activity depending on the presence of the lipase canonical serine.

This project allowed the characterization of the first phospholipase involved in lipid droplet biology in trypanosomes, and paves the way for new studies to elucidate the functions of this organelle in protozoan parasites and in other, more complex eukaryotic cellular types.

Keywords: *Trypanosoma brucei*, lipid droplets, phospholipase, patatin, metabolism, lipids.

Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury Dr. Catherine Jackson, Dr. Maude Lévêque, Pr. Rachel Cerdan et Dr. Sébastien Mongrand pour avoir accepté de lire et d'évaluer ce travail.

Un grand merci à mon directeur de thèse, le Pr. Loïc Rivière. J'ai commencé à travailler avec toi sur la patate pendant le premier confinement et à l'époque, je ne pensais pas qu'un stage biblio sur une protéine avec un nom un peu rigolo finirait sur cette thèse et un super projet qui ne fait que démarrer. Merci pour la qualité de la science que tu m'as enseignée, tes qualités humaines et ton soutien constant. Et pour tous les surnoms que je ne compte plus.

Je tiens à remercier toute l'équipe iMET pour ces trois années partagées. Merci au Dr. Frédéric Bringaud (dai-sensei et non pas die, sensei) pour toute ta connaissance que tu partages avec nous. Merci Manu pour tes conseils et les apéros, et merci à Yoann, Corinne, Nico, Mohammad, Kathyanna ; merci ++ à Aline pour tout.

Merci à ma super copine de bureau Chloé, on aura bien saoulé tout le bureau pendant l'écriture et c'était top ; à tous les gâteaux, les thés et notre envie constante de tout plaquer pour aller manger un curry jap.

Merci à tout MFP et surtout à ParaMyc, en particulier aux Hocus Pocus Ophélie et Chloé, et à Nico, Nico et Nico (je vous laisse décider qui est qui) pour tout ce que vous faites pour faire vivre l'unité ; merci de m'avoir accueillie dans la désormais étoilée MFP Sailing Team.

Merci à toutes les personnes qui ont participé à ce projet, et qui continuerons de le porter.

Merci à l'Université de Nagasaki pour votre accueil chaleureux ; merci à Daniel et à la JSPS de m'avoir permis de faire cette mobilité, et à tous ceux au TMGH/NEKKEN qui ont fait de ce voyage une expérience que je n'oublierai jamais.

Merci à tous les amis de Bordeaux, Quimper et ailleurs. Merci à Chloé (je sais pas si on te l'a déjà dit mais apparemment on s'est bien trouvées), Rija et Simon pour ces trois dernières années qui n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci aux Spice Girls bretonnes Anaïs, Clémence, Marie et Pauline.

Enfin, merci à ma famille et surtout à mes parents pour votre soutien sans faille depuis toujours, dans tout ce que j'entreprends

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Remerciements	5
Liste des abréviations.....	10
Liste des figures	12
Liste des tableaux.....	13
Préambule	14
1. Introduction	16
1.1. Les trypanosomes africains.....	18
1.1.1. Découverte	18
1.1.2. Taxonomie et phylogénie des Kinétoplastidés	19
1.1.3. La mouche tsétsé.....	21
1.1.4. Cycles évolutifs.....	25
1.1.4.1. <i>Trypanosoma brucei brucei, gambiense et rhodesiense</i>	25
1.1.4.2. <i>Trypanosoma congolense</i>	27
1.1.4.3. <i>Trypanosoma vivax</i>	27
1.1.5. Tropismes parasitaires.....	29
1.1.5.1. Trypanosomes humains	29
1.1.5.2. Trypanosomes animaux.....	31
1.1.6. Diagnostics et traitements.....	35
1.1.6.1. Méthodes de diagnostic.....	35
1.1.6.2. Traitements	37
1.1.7. Biologie des trypanosomes africains	39
1.1.7.1. Organisation et caractéristiques cellulaires	39
1.1.7.2. Le génome	41
1.1.7.3. Cycle cellulaire.....	43
1.1.7.4. Les protéines de surface.....	45
1.1.7.5. La variation antigénique.....	47
1.1.7.6. Les facteurs trypanolytiques	49
1.1.7.7. Le modèle d'étude <i>Trypanosoma brucei</i>	51
1.1.7.8. Le métabolisme énergétique.....	51
1.1.7.8.1. Chez la forme sanguine	51

1.1.7.8.2.	Chez la forme procyclique	53
1.1.7.8.3.	Le métabolisme lipidique	54
1.2.	Les phospholipases A.....	58
1.2.1.	Phospholipases A₁	59
1.2.2.	Phospholipases A₂	59
1.2.2.1.	Cytosoliques	59
1.2.2.2.	Sécrétées	60
1.2.2.3.	Acétylhydrolase du facteur d'activation plaquettaire.....	60
1.2.2.4.	Calcium-indépendantes.....	62
1.2.3.	Lysophospholipases.....	62
1.2.4.	« Phospholipases A and Lysophospholipases in protozoan parasites »	63
1.2.4.1.	Présentation de la revue	63
1.2.4.2.	Revue.....	63
1.3.	Les gouttelettes lipidiques	65
1.3.1.	Biogenèse des gouttelettes lipidiques	67
1.3.2.	Adressage des protéines aux gouttelettes lipidiques	71
1.3.2.1.	Protéines de classe I et la voie ERTOLD.....	71
1.3.2.2.	Protéines de classe II et la voie CYTOLD.....	72
1.3.3.	Dégradation des gouttelettes lipidiques.....	73
1.3.3.1.	Lipolyse	75
1.3.3.2.	Lipophagie	77
1.3.3.3.	Les perilipins : gardiennes des lipides neutres	77
1.3.4.	Interactions avec les autres compartiments : la communauté des lipides	78
1.3.4.1.	Mitochondries	78
1.3.4.2.	Péroxyosomes.....	79
1.3.5.	Les gouttelettes lipidiques chez les parasites protozoaires	80
1.3.5.1.	<i>Plasmodium</i> sp.	80
1.3.5.2.	<i>Toxoplasma gondii</i>	81
1.3.5.3.	<i>Leishmania</i> sp.	82
1.3.5.4.	<i>Trypanosoma cruzi</i>	83
1.3.5.5.	<i>Trypanosoma brucei</i>	83
	Projet de recherche.....	85
2.	Matériels et méthodes	86
2.1.	Matériels.....	87

2.1.1.	Lignées cellulaires	87
2.1.1.1.	Trypanosomes	87
2.1.1.2.	Bactéries	87
2.1.2.	Milieux de culture	87
2.1.2.1.	<i>T. brucei brucei</i> forme procyclique	87
2.1.2.2.	<i>T. brucei brucei</i> forme sanguine	89
2.1.2.3.	<i>T. congolense</i>	89
2.1.2.4.	<i>E. coli</i>	89
2.1.3.	Milieux de congélation	91
2.1.4.	Vecteur d'expression : pLew100	91
2.2.	Méthodes.....	93
2.2.1.	Biologie moléculaire	93
2.2.1.1.	Extraction d'ADN génomique	93
2.2.1.2.	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	93
2.2.1.3.	Electrophorèse sur gel d'agarose	94
2.2.1.4.	Purification des produits PCR	94
2.2.1.5.	Clonage et transformation de bactéries compétentes	94
2.2.1.6.	Extraction d'ADN plasmidique.....	95
2.2.1.7.	Dosage de l'ADN	95
2.2.1.8.	Séquençage	97
2.2.2.	Biologie cellulaire	97
2.2.2.1.	Transfection de plasmides dans <i>T. brucei</i>	97
2.2.2.2.	Transfection de cassettes par CRISPR/CAS9 dans <i>T. brucei</i> et <i>T. congolense</i>	99
2.2.2.3.	Clonage des parasites	99
2.2.2.4.	Courbes de croissance	100
2.2.2.5.	Induction de la formation de gouttelettes lipidiques	100
2.2.3.	Biochimie	100
2.2.3.1.	Extraits protéiques totaux	100
2.2.3.2.	SDS-PAGE.....	102
2.2.3.3.	Western blot.....	102
2.2.3.4.	Solution oléate – BSA	102
2.2.3.5.	Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	103
2.2.3.6.	Protéomes totaux.....	103
2.2.4.	Imagerie.....	104
2.2.4.1.	Immunofluorescence.....	104

2.2.4.2.	Marquage des gouttelettes lipidiques.....	104
2.2.4.3.	Quantification des gouttelettes lipidiques.....	106
2.2.5.	Statistiques et traitement des données.....	106
2.2.5.1.	Analyses statistiques	106
2.2.5.2.	Analyse des données de protéomique sur les parasites sauvages et Δ TbPat.....	106
3.	Résultats	108
3.1.	Amélioration de la technologie des ciseaux moléculaires CRISPR/CAS9 chez la forme sanguine de <i>Trypanosoma congolense</i>	109
3.1.1.	“<i>Streptococcus pyogenes</i> Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in <i>Trypanosoma</i> and <i>Leishmania</i>”	109
3.1.1.1.	Présentation de l’article	109
3.1.1.2.	Article	110
3.2.	Caractérisation de TbPat	111
3.2.1.	“A patatin-like phospholipase is essential to lipid droplet dynamics in <i>Trypanosoma brucei</i>”	111
3.2.1.1.	Présentation de l’article	111
3.2.1.2.	Article	113
3.2.2.	TbPat est une protéine ERTOLD	146
3.2.3.	Analyse de la localisation de TbPat par immunomicroscopie électronique .	148
3.2.4.	Effet de l’ajout d’oléate sur le protéome de <i>Trypanosoma brucei</i>.....	150
3.2.4.1.	Chez les parasites sauvages.....	150
3.2.4.2.	Chez les parasites Δ TbPat.....	154
4.	Discussion et perspectives.....	157
4.1.	Le protéome des gouttelettes lipidiques de <i>Trypanosoma brucei</i>.....	159
4.1.1.	Identification de nouvelles protéines associées aux gouttelettes lipidiques	159
4.1.1.1.	TbSeipin	159
4.1.1.2.	TbPLIN.....	161
4.1.2.	Caractériser le protéome des gouttelettes lipidiques	163
4.1.3.	Le lipidome des gouttelettes lipidiques.....	167
4.2.	Quels sont les rôles des gouttelettes lipidiques chez les protozoaires ? ..	168
4.2.1.	Interactions hôtes - parasites.....	168
4.2.2.	Communications inter-organites.....	169
5.	Conclusion.....	172
6.	Bibliographie	174

Liste des abréviations

aa	acide aminé	MAG	Monoacylglycérol
ADN	Acide désoxyribonucléique	MEM	Milieu minimum essentiel
ADNg	ADN génomique	N	Noyau
ADNk	ADN kinétoplastique	NECT	Thérapie de combinaison Nifurtimox/Eflornithine
ARN	Acide ribonucléique	OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ARNg	ARN guide	PAF	Facteur d'activation plaquettaire
ARNi	ARN interférent	pb	paire de bases
ARNm	Acide ribonucléique messenger	PBS	Tampon phosphate salin
ATP	Adénosine triphosphate	PC	Phosphatidylcholine
BioID	Identification de biotinylation dépendante de la proximité	PCF	Forme procyclique
BSA	Albumine de sérum bovin	PCR	Réaction de polymérisation en chaîne
BSF	Forme sanguine	PE	Phosphatidyléthanolamine
Cas9	Protéine 9 associée à CRISPR	PFA	Paraformaldéhyde
CoA	Coenzyme A	PGF_{2α}	Prostaglandine F _{2α}
cPLA2	Phospholipase A2 cytosolique	PI	Phosphatidylinositol
CRISPR	Répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées et groupées	PL	Phospholipide
Cryo-EM	Cryo-microscopie électronique	PLA1/2	Phospholipase A1/A2
CYTOLD	Cytosol vers gouttelette lipidique	PLB	Phospholipase B
Da	Dalton	PLC	Phospholipase C
DAG	Diacylglycérol	PLP	Phospholipase <i>patatin-like</i>
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole	PNPLA	Protéine à domaine phospholipase <i>patatin-like</i>
EC	Commission des enzymes	PS	Phosphatidylsérine
ELISA	Dosage d'immunoabsorption enzymatique	PUFA	Acides gras polyinsaturés

ERES	Sites d'export du réticulum endoplasmique	rDNA	ADN ribosomique
ERTOLD	Réticulum endoplasmique vers gouttelette lipidique	RE	Réticulum endoplasmique
GFP	Protéine fluorescente verte	RMN	Résonance magnétique nucléaire
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	SCM	Sites de contacts membranaires
GR	Globule rouge	SDM	Milieu semi-défini
HDL	Lipoprotéine de haute densité	SDS	Sodium dodecyl sulfate
iEM	Immunomicroscopie électronique	SNC	Système nerveux central
IF	Immunofluorescence	sPLA2	Phospholipase A2 sécrétée
Ig	Immunoglobuline	SRA	Gène associé à la résistance au sérum
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium	SVF	Sérum de veau fœtal
iPLA2	Phospholipase A2 indépendante du calcium	TAA	Trypanosomiase animale africaine
K	Kinétoplaste	TAG	Triacylglycérol
LAMP	Amplification isotherme médiée par les boucles	TetO	Opérateur de la tétracycline
LB	Lysogeny broth	TetR	Répresseur de la tétracycline
LD	Gouttelette lipidique	THA	Trypanosomiase humaine africaine
LDAC	Complexe d'assemblage des gouttelettes lipidiques	U-ExM	Microscopie d'expansion sur ultrastructure
LDL	Lipoprotéine de faible densité	VSG	Glycoprotéine variable de surface
LysoPL	Lysophospholipide	WB	Western-blot
LysoPLA	Lysophospholipase	wt	sauvage

Liste des figures

Figure 1 : Classification des Kinétoplastidés.	17
Figure 2 : Morphologie des glossines.	20
Figure 3 : Distribution des mouches tsétsé groupes <i>morsitans</i> , <i>fusca</i> et <i>palpalis</i> en Afrique.	22
Figure 4 : Cycle évolutif de <i>Trypanosoma brucei</i> sous-espèces <i>brucei</i> , <i>gambiense</i> et <i>rhodesiense</i>	24
Figure 5 : Variation du cycle évolutif des trypanosomes africains dans la mouche tsétsé.	26
Figure 6 : Cycle évolutif de <i>Trypanosoma congolense</i>	28
Figure 7 : Distribution géographique des trypanosomes <i>Salivaria</i>	30
Figure 8 : Cas de trypanosomiases humaines africaines rapportés entre 2000 et 2020.	34
Figure 9 : Schéma de l'architecture cellulaire de <i>Trypanosoma brucei</i>	38
Figure 10 : Schéma de l'architecture cellulaire de <i>Trypanosoma congolense</i> forme sanguine.	40
Figure 11 : Division cellulaire chez la forme procyclique de <i>Trypanosoma brucei</i>	42
Figure 12 : Mécanismes de modification des VSG chez <i>Trypanosoma brucei</i>	44
Figure 13 : La variation antigénique chez les trypanosomes africains.	46
Figure 14 : La réponse à APOL1 chez <i>Trypanosoma brucei</i> sous-espèces <i>brucei</i> , <i>rhodesiense</i> et <i>gambiense</i>	48
Figure 15 : La production d'ATP chez la forme sanguine de <i>Trypanosoma brucei</i>	50
Figure 16 : La production d'ATP chez les formes procycliques de <i>Trypanosoma brucei</i> en absence ou présence de glucose.	52
Figure 17 : La voie de Kennedy chez <i>Trypanosoma brucei</i>	55
Figure 18 : Structure d'un phospholipide et sites d'hydrolyse des phospholipases A1, A2, B, C et D..	57
Figure 19 : Fonctions associées aux phospholipases <i>patatin-like</i> chez les organismes.	61
Figure 20 : Schéma d'une gouttelette lipidique.	64
Figure 21 : synthèse des TAG dans le réticulum endoplasmique chez les mammifères.	66
Figure 22 : Biogénèse des gouttelettes lipidique chez l'Homme.	66
Figure 23 : Structure de cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) et modèle de l'homodécamère de la protéine Seipin de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Sei1).	68
Figure 24 : les voies d'adressage des protéines aux gouttelettes lipidiques.	70
Figure 25 : la lipolyse chez l'Homme.	74
Figure 26 : Mécanisme de lipophagie chez l'Homme.	76
Figure 27 : Schéma du plasmide pLew100.	90
Figure 28 : Schéma du protocole de transfection de cassettes par le système CRISPR/CAS9 dans les trypanosomes africains.	98
Figure 29 : Script de la macro utilisée sur Fiji pour la quantification de l'aire des gouttelettes lipidiques.	105
Figure 30: Localisation de GFP-TbPat chez différents clones procycliques.	145
Figure 31: Immunomicroscopie électronique des parasites exprimant GFP-TbPat.	147
Figure 32: Impact de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme procyclique sauvage.	149
Figure 33: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme sanguine sauvage.	151
Figure 34: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme procyclique Δ TbPat.	153
Figure 35: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme sanguine Δ TbPat.	155
Figure 36 : Distribution de TbPat-10TY chez les parasites procycliques Δ TbSeipin avec ou sans oléate.	158
Figure 37 : Localisation de TbPLIN et interaction avec TbPat.	160
Figure 38 : Protéines ayant une localisation au niveau des gouttelettes lipidiques d'après la base de données TrypTag.	162

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques principales des maladies causées par les différentes espèces de trypanosomes africains.	32
Tableau 2 : Médicaments prescrits lors d'une infection par différents trypanosomes africains.	36
Tableau 3 : Antibiotiques.	88
Tableau 4 : Amorces.	92
Tableau 5 : guides ARN.	96
Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires.	101
Tableau 7 (Partie 1) : Orthologues chez <i>T. brucei</i> des protéines associées aux gouttelettes lipidiques mentionnées dans la section 1.3.	164
Tableau 7 (Partie 2) : Orthologues chez <i>T. brucei</i> des protéines associées aux gouttelettes lipidiques mentionnées dans la section 1.3.	166

Préambule

Les travaux effectués au cours de ces trois années de thèse ont été majoritairement consacrés à l'étude d'une phospholipase dite *patatin-like* chez le parasite *Trypanosoma brucei* et son rôle dans la biologie d'un compartiment encore peu connu et à récent intérêt chez les cellules eucaryotes, les gouttelettes lipidiques. Cependant, j'ai participé pendant ma thèse à un projet annexe au sein du laboratoire, qui est également présenté dans ce manuscrit.

Ainsi, les résultats sont séparés en deux parties distinctes, représentant les deux projets auxquels j'ai participé :

1. Amélioration de la technologie des ciseaux moléculaires CRISPR/CAS9 chez le parasite *Trypanosoma congolense*, projet présentant la technique principalement utilisée pour la modification du génome des trypanosomes pendant cette thèse. Cette partie contient l'article publié résultant en parti de ce projet : *Streptococcus pyogenes Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in Trypanosoma and Leishmania*, publié dans la revue Molecular Microbiology.
2. Caractérisation de TbPat, phospholipase *patatin-like* impliquée dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez les trypanosomes africains. Cette partie présente le projet principal de la thèse ; elle contient l'article *A patatin-like phospholipase is essential to lipid droplet dynamics in Trypanosoma brucei* et des résultats non-inclus dans l'article.

La discussion est centrée sur les gouttelettes lipidiques de *T. brucei*, avec i) l'implication de nouvelles protéines associées à ce compartiment, ii) des résultats préliminaires sur ces protéines et enfin iii) les potentiels rôles des gouttelettes lipidiques chez les trypanosomes.

1. Introduction

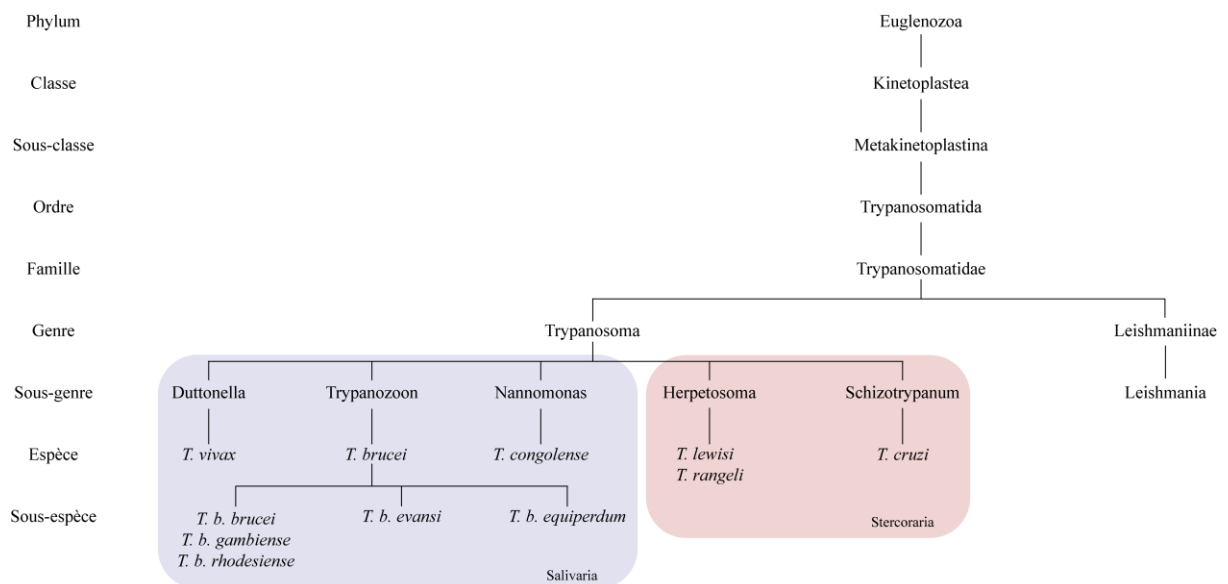


Figure 1 : Classification des Kinétoplastidés.

Basée sur l'outil *Taxonomy Browser* du *National Center for Biotechnology Information* taxon 5653 (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=5653>). Réalisé sur Illustrator.

1.1. Les trypanosomes africains

Les trypanosomes africains sont des parasites unicellulaires, extracellulaires et flagellés. Ils font partie, avec les trypanosomes américains (*Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas) et *Leishmania* sp. (responsable des différentes formes de leishmaniose) de la classe des Kinétoplastidés. Les organismes de ce rang sont caractérisés par la présence dans leur mitochondrie unique d'un réseau d'ADN circulaire et concaténé, le kinétoplaste (Stuart et al. 2008). Ces pathogènes sont responsables de maladies mortelles et négligées à la fois chez l'Homme et les animaux (Giordani et al. 2016). Ils sont majoritairement transmis par l'intermédiaire d'insectes vecteurs endémiques aux zones où les parasites sévissent, mais certaines sous-espèces ont évolué et ne nécessitent plus la présence du vecteur pour compléter leur cycle évolutif, élargissant leur présence géographique (Lai et al. 2008). Les trypanosomes africains représentent un groupe de pathogènes animaux et humains importants, mais ce sont également des organismes modèles associés à de nombreuses découvertes scientifiques (Viegas et Figueiredo 2022).

1.1.1. Découverte

Les trypanosomes obtiennent leur nom en 1843 par le médecin français David Gruby, qui décrit alors un parasite retrouvé dans le sang de batraciens, *Trypanosoma sanguinis*. *Trypanosoma* vient du grec *trupanon* qui signifie tarière, en rapport avec le mouvement des parasites, et *soma*, le corps.

La première mention de trypanosomiase remonte à l'Égypte ancienne. Dans un manuscrit vétérinaire des Papyrus de Kajun datant du 2^{ème} millénaire av. J.-C., une maladie ressemblant à la Nagana, maladie causée par des trypanosomes africains chez le bétail, est décrite (Steverding 2008). C'est ensuite en 1374 que la maladie du sommeil est mentionnée pour la première fois, lorsque l'historien Ibn Khaldun rapporte dans ses écrits la mort de l'Empereur du Mali, le sultan Mari Jata. Il y décrit des symptômes correspondant à la trypanosomiase humaine, dont de nombreux habitants de la région sont victimes (Steverding 2008). C'est durant la période de traite des esclaves que la phase terminale de la trypanosomiase humaine est décrite par le chirurgien naval anglais John Atkins, en 1734. À cette époque, les marchands d'esclaves recherchent des signes de la maladie pour éviter la propagation sur les bateaux en direction des États-Unis (Cox 2004).

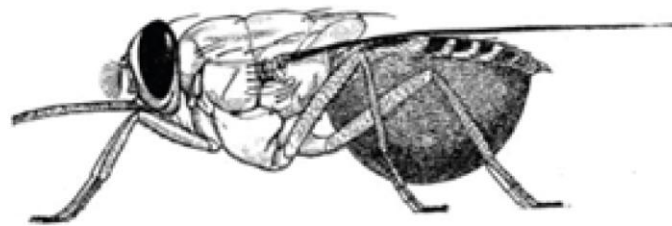
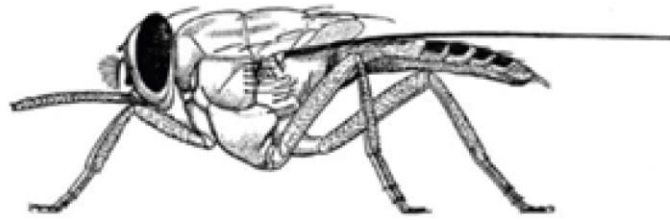
Durant le 19^{ème} siècle, un nombre croissant d'explorateurs, militaires et missionnaires présents en Afrique Centrale ou de l'Ouest rapportent des symptômes similaires à ceux décrits par Atkins et d'autres médecins de l'époque. L'explorateur écossais David Livingston est le premier à suggérer un lien entre la Nagana et la morsure des mouches tsétsé en 1852 après avoir observé la mort d'animaux de bétail piqués par les mouches. En 1881, le vétérinaire Griffith Evans décrit pour la première fois la présence de trypanosomes plus tard nommés *Trypanosoma evansi* dans le sang de chevaux, chameaux et mules souffrant d'une maladie appelée Surra (Cox 2004). Quelques années plus tard, David Bruce identifie *Trypanosoma brucei brucei* comme agent de la Nagana et fait également le lien entre la maladie et la présence de la mouche tsétsé (Bruce 1895). La première observation de trypanosomes dans le sang humain se fait en 1901 par un chirurgien anglais, Robert Michael Forbe. Le chirurgien fait part de sa découverte au parasitologue Joseph Everett Dutton, qui en 1902 nomme le parasite *Trypanosoma gambiense*, maintenant appelé *Trypanosoma brucei gambiense*. Un an plus tard, David Bruce identifie formellement la glossine comme vecteur du parasite. En 1904, le médecin Alphonse Broden découvre *Trypanosoma congolense* et l'année d'après, le médecin naval Hans Ziemann caractérise *Trypanosoma vivax*. Enfin, en 1910, *Trypanosoma brucei rhodesiense* est identifié par les parasitologues John William Watson Stephens et Harold Benjamin Fantham (Cox 2004).

1.1.2. Taxonomie et phylogénie des Kinétoplastidés

Les trypanosomes et les leishmanies sont les principaux pathogènes de la famille des Trypanosomatidae (Figure 1). Aujourd'hui, 18 espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'Homme ont été identifiées. Ces parasites causent deux formes majeures de leishmaniose selon le type de cellules parasitées : la leishmaniose cutanée, forme la plus commune, et la leishmaniose viscérale, forme la plus sévère avec 95% de mortalité sans traitement. Entre 0,9 et 1,7 million de cas de leishmaniose sont déclarés chaque année. Les parasites sont transmis par la morsure de femelles phlébotomes et réalisent leur cycle évolutif entre l'hôte mammifère et l'insecte vecteur (Steverding 2017).

Plusieurs tentatives de classification des trypanosomes ont été proposées à la suite de la découverte de nouvelles espèces ou de présence de parasites dans de nouveaux hôtes.

A.



B.

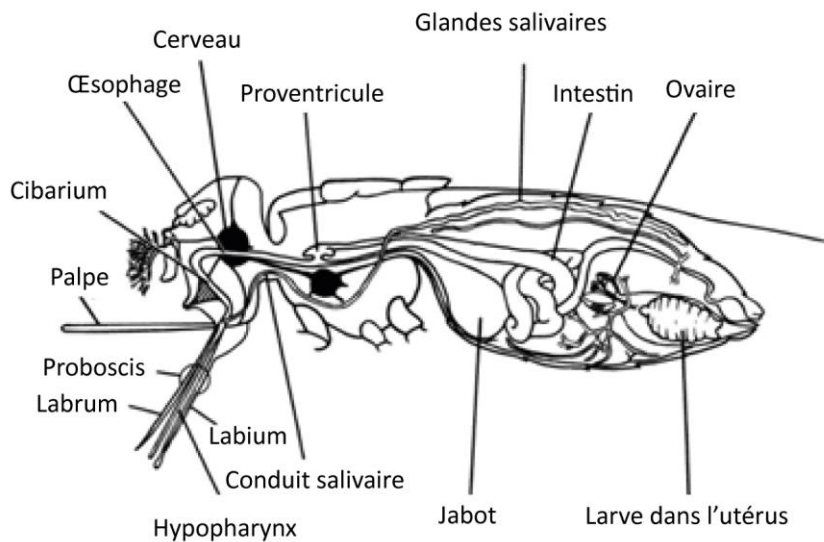


Figure 2 : Morphologie des glossines.

A. Mouche tsétsé *Glossina morsitans* femelle avant (haut) et après (bas) un repas sanguin (Krinsky 2019). **B.** Représentation schématique d'une glossine femelle. Traduit d'après (Aksoy 2003).

En 1964, Hoare propose une classification du genre *Trypanosoma* en deux sections, selon le mode de transmission : Stercoraria, où la transmission se fait par l'intermédiaire de déjections

du vecteur contaminé, et *Salivaria*, parasites dont la transmission est faite par la salive du vecteur infecté (Figure 1) (Hoare 1964). *Trypanosoma cruzi* est un parasite *Stercoraria* responsable de la trypanosomiase américaine, ou maladie de Chagas. Cette zoonose majoritairement présente en Amérique Latine où elle est endémique et transmise par les insectes de type punaises hématophages de la sous-famille des *Triatominae*. 6 à 7 millions de personnes sont actuellement infectées par *T. cruzi*, avec 12 000 morts par an (Données OMS). La maladie de Chagas est composée d'une phase aigüe de quelques semaines suivie d'une phase chronique qui se déclare pour 15 à 30% des personnes infectées entre 10 et 25 ans après la phase aigüe (Steverding 2014). Les parasites dits *Salivaria* incluent *Trypanosoma congolense* et *Trypanosoma vivax*, tous deux responsables de la Nagana ou Trypanosomiase Animale Africaine (TAA), ainsi que les différentes sous-espèces de *Trypanosoma brucei* : *T. brucei brucei*, également responsable de la TAA, et *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*, provoquent quant à eux la maladie du sommeil chez l'Homme, également appelée Trypanosomiase Humaine Africaine (THA). *Trypanosoma brucei equiperdum*, responsable de la Dourine chez les équidés, et *Trypanosoma brucei evansi*, agent de la Surra chez de nombreux mammifères, sont des sous-espèces de *T. brucei* ayant perdu une partie (*T. b. equiperdum*) ou la totalité (*T. b. evansi*) de leur ADN kinétoplastique (ADNk) (Lai et al. 2008).

1.1.3. La mouche tsétsé

Les trypanosomes africains sont transmis par des vecteurs insectes hématophages appelés mouches tsétsé. La transmission peut être cyclique ou mécanique selon l'espèce, et implique des restrictions géographiques des parasites en lien avec les vecteurs. Les vecteurs cycliques des trypanosomes africains sont les mouches hématophages du genre *Glossina*, communément appelées mouches tsétsés. Elles furent observées pour la première fois en 1830. Ces mouches, d'une taille allant de 6 à 14 mm, sont caractérisées par la présence d'une trompe appelée proboscis qui leur permet de percer la peau et les capillaires des animaux pour se nourrir de leur sang (Figure 2). Les 33 espèces de diptères de la famille des *Glossinidae* sont retrouvées sur une aire d'environ 10 millions de km² en Afrique subsaharienne, qui représente la « ceinture de la mouche tsétsé » (Figure 3). Les glossines sont réparties en trois sous-groupes séparés selon leur zone d'habitat.

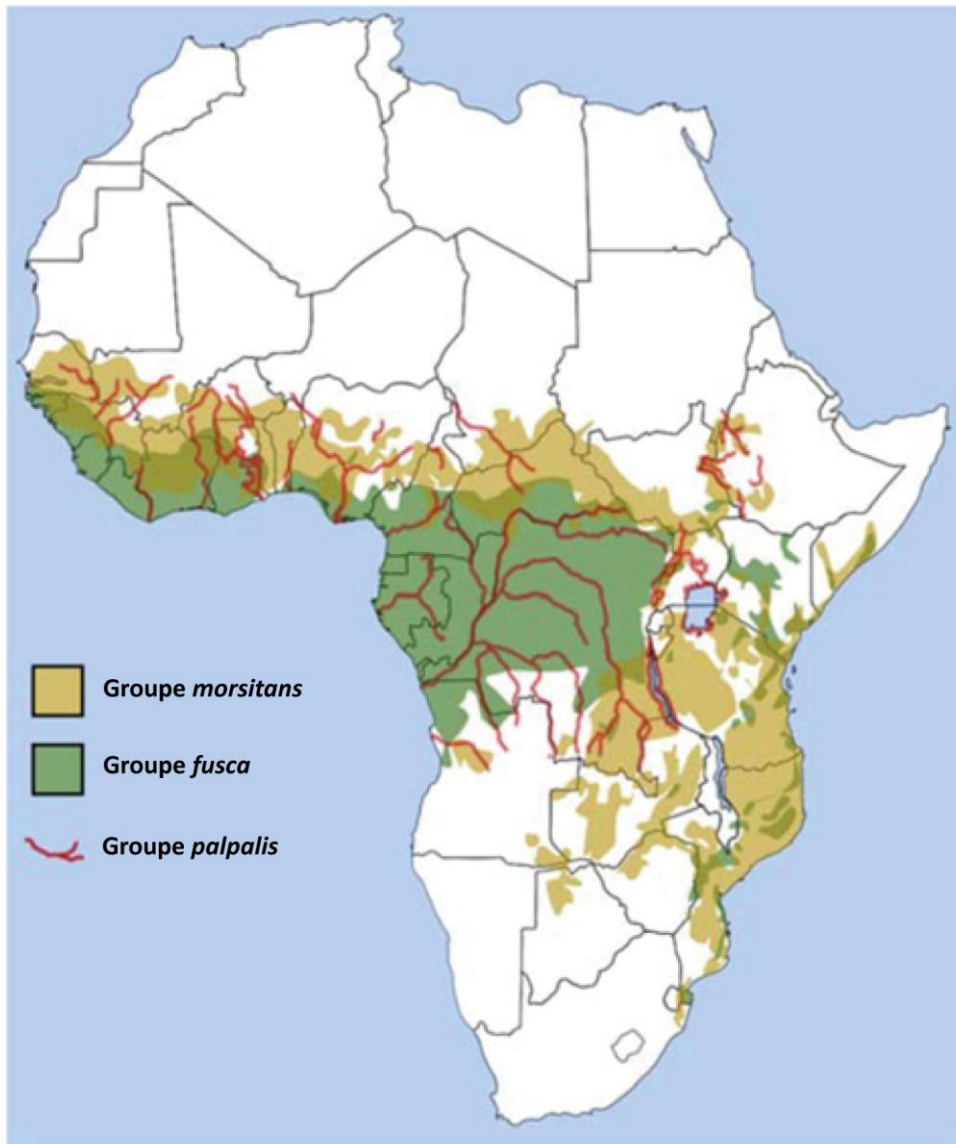


Figure 3 : Distribution des mouches tsétsé groupes *morsitans*, *fusca* et *palpalis* en Afrique.
Traduit d'après (Krinsky 2019).

Le sous-groupe *fusca* (sous-genre *Austenina*) est retrouvé dans les forêts de l'Afrique de l'Ouest et forme le groupe *Glossina* primitif à partir duquel les autres sous-genres ont évolué en s'adaptant aux différentes conditions environnementales rencontrées. Le sous-groupe *mortisans*, sous-genre *Glossina*, est retrouvé dans les savanes. Le sous-groupe *palpalis*, qui correspond au sous-genre *Nemorhina*, est présent dans la végétation près des rivières et lacs en Afrique Centrale et Afrique de l'Ouest (Figure 3) (Leak 1998; Krafur 2009). Les mouches ont une durée de vie allant de quelques semaines pour les mâles à 4 mois pour les femelles (Krinsky 2019). Les vecteurs principaux de *T. b. gambiense* sont les glossines du sous-groupe *palpalis*, tandis que *T. b. rhodesiense* est majoritairement transmis par les espèces du sous-genre *mortisans*. Dans le cas des parasites causant la Nagana, *T. brucei brucei* est transmis à la fois par les glossines *palpalis* et *mortisans* et *T. vivax* et *T. congolense* sont transmis par les 3 groupes. Ces parasites, à l'exception de *T. vivax* qui possède d'autres moyens de transmission, dépendent de la présence de la mouche pour leur cycle et sont confinés à la ceinture (Figure 3). Les mâles et femelles infectés transmettent les parasites par leur salive lors du repas sanguin (Krinsky 2019). La lutte anti-vectorielle en Afrique représente une approche majeure dans l'éradication des trypanosomiasés africaines. Au cours des années, plusieurs techniques plus ou moins directes ont été employées : destruction de l'habitat des glossines, mise en place de pièges pour les capturer, insecticides ou encore lâcher de mâles rendus stériles par irradiation (Krinsky 2019).

En plus de la transmission cyclique, *T. vivax* peut être transmis mécaniquement. Cette méthode de transmission se produit lorsqu'un vecteur prend un repas sanguin chez deux individus/animaux différents à quelques secondes/minutes d'intervalle. Elle ne nécessite pas de multiplication ou différenciation du parasite dans le vecteur. Ce phénomène se produit chez les mouches tsétsés, mais également chez d'autres insectes hématophages tels que les mouches de la famille des Tabanidae ou du genre *Stomoxys*. La transmission mécanique a permis à *T. vivax* de ne plus dépendre de la présence des glossines et ainsi de se répandre hors de l'Afrique subsaharienne (Desquesnes, Gonzatti et al. 2022).

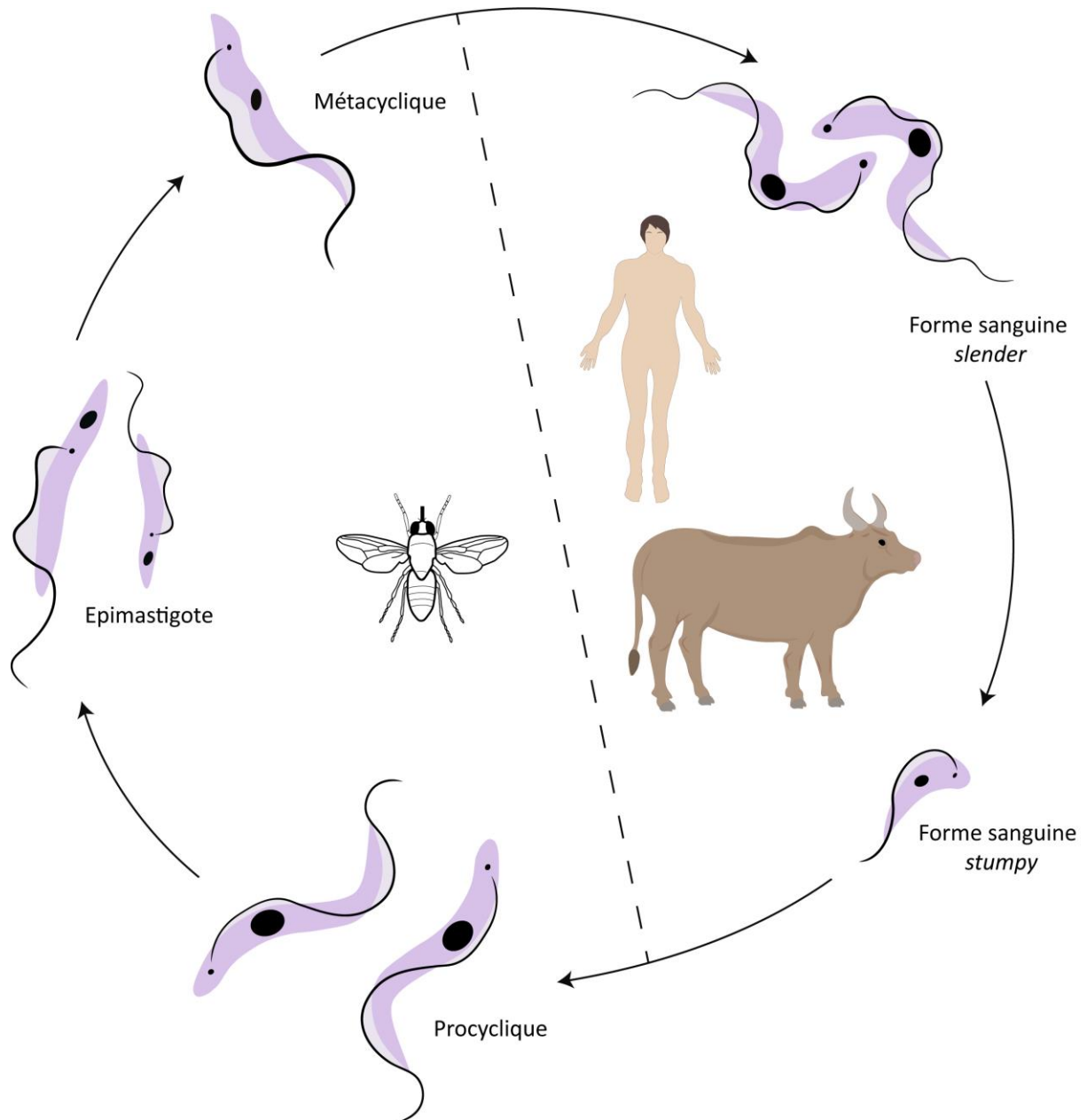


Figure 4 : Cycle évolutif de *Trypanosoma brucei* sous-espèces *brucei*, *gambiense* et *rhodesiense*.

Réalisé sur Illustrator.

1.1.4. Cycles évolutifs

Bien que génétiquement proches, les trypanosomes africains possèdent des cycles évolutifs différents et plus ou moins complexes, en adaptation avec leur environnement et leurs hôtes.

1.1.4.1. *Trypanosoma brucei brucei*, *gambiense* et *rhodesiense*

T. b. brucei, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* alternent entre 2 hôtes (cycle dixène) : la mouche tsétsé, et l'hôte mammifère. Tout au long de leur cycle évolutif, les parasites sont en constante adaptation morphologique (Figure 4). L'infection de l'hôte mammifère (Homme pour *T. b. gambiense*, bétail ou animal sauvage pour *T. b. brucei* et tous pour *T. b. rhodesiense*) démarre lorsqu'une mouche tsétsé le pique lors d'un repas sanguin. Les parasites au stade métacyclique, présents dans les glandes salivaires de la mouche, sont injectés dans le derme du mammifère. Les parasites se différencient alors en trypomastigotes sanguins. On parle de forme sanguine répliquative longue et fine, aussi appelée « *slender* » en anglais. Les parasites se multiplient et finissent par entrer dans la circulation sanguine, où ils continuent de se répliquer. Lorsque la parasitémie atteint une concentration critique dans l'hôte, la forme *slender* se différencie en forme non répliquative courte et trapue, ou « *stumpy* » par le phénomène de *quorum sensing*, processus par lequel des oligopeptides stimulent une voie de transduction menant à la différenciation du parasite (Rojas et al. 2019). Cette différenciation est accompagnée de modifications morphologiques, métaboliques et transcriptionnelles permettant de séparer ces deux formes (McDonald et al. 2018). Le passage de *slender* à *stumpy* permet notamment d'éviter la mort de l'hôte due à une trop forte concentration de parasites dans ses niches de multiplication, mais c'est également la forme préadaptée au passage dans le vecteur (Fenn et Matthews 2007; Wamwiri et Changasi 2016).

Lorsqu'une mouche vient prendre un repas sanguin chez un mammifère infecté, les parasites dans le sang sont récupérés par l'insecte. Les parasites *stumpy*, alors retrouvés dans l'estomac de la mouche, se différencient en quelques heures en forme répliquative dite procyclique (Figures 4 et 5). Les parasites migrent vers l'intestin moyen de la mouche tsétsé puis vers le proventricule où ils se différencient en forme épimastigote (Figures 4 et 5). Les particularités de cette forme sont la position du kinétoplaste, qui migre en position antérieure au noyau et la division asymétrique, avec la formation d'un épimastigote long divisible et un épimastigote court non répliquatif (Figure 4) (Van Den Abbeele et al. 1999; Rotureau et Van Den Abbeele 2013).

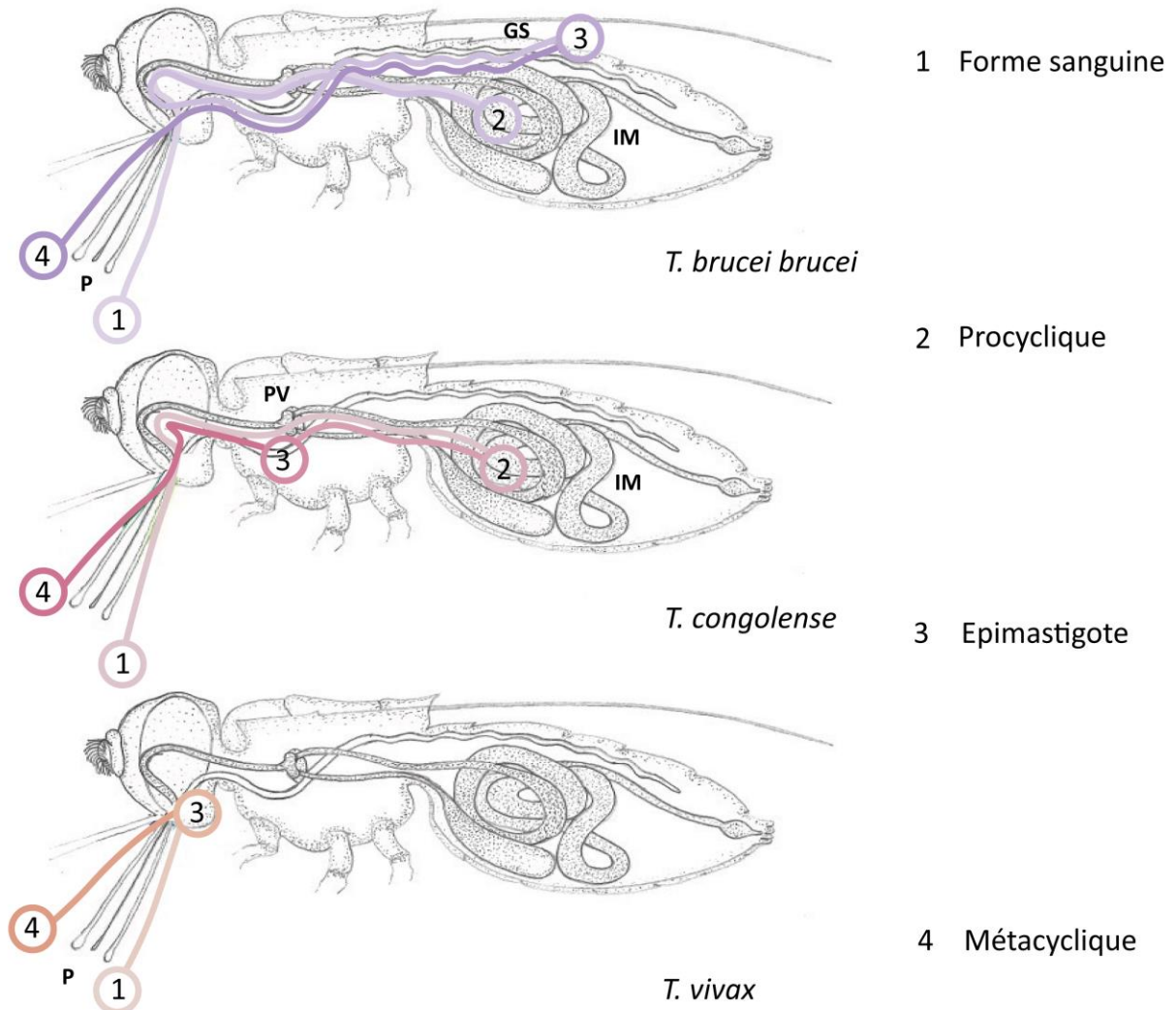


Figure 5 : Variation du cycle évolutif des trypanosomes africains dans la mouche tsétsé.

T. brucei, *T. congolense* et *T. vivax* empruntent des routes différentes dans la mouche tsétsé, impliquant des modifications dans le développement des formes métacycliques infectieuses adaptées pour le passage dans l'hôte mammifère. 1, forme sanguine ; 2, procyclique ; 3, épimastigote ; 4, métacyclique ; P, proboscis ; GS, glandes salivaires ; IM, intestin moyen ; PV, proventricule. Traduit et adapté d'après (Jackson et al. 2015)

Les trypanosomes continuent leur parcours dans la mouche et arrivent dans les glandes salivaires de l'insecte, où les épimastigotes courts s'attachent à l'épithélium par le flagelle. Après multiplication, les parasites finissent par se différencier en métacycliques non réplicatifs et sont relâchés dans le lumen des glandes salivaires. Ils sont alors prêts à infecter un nouveau mammifère lors du prochain repas sanguin de la glossine (Figure 5) (Baral 2010). La maturation des parasites dans la mouche dure entre 20 et 30 jours (Aksoy, Gibson, et Lehane 2003).

1.1.4.2. *Trypanosoma congolense*

T. congolense, tout comme *T. b. brucei*, possède un cycle de vie dixène avec alternance entre la mouche tsétsé et un hôte mammifère animal (Figure 6). Ce parasite est endémique dans toute l'Afrique subsaharienne. *T. congolense* est, avec *T. b. brucei* et *T. vivax*, responsable de la Nagana et en est même l'agent principal. Une différence majeure entre les cycles évolutifs de *T. b. brucei* et *T. congolense* est l'absence de la forme *stumpy* chez *T. congolense*, bien qu'il soit capable d'une forme de *quorum sensing* amenant à l'arrêt de la croissance parasitaire, mais sans modifications morphologiques (Silvester et al. 2017). Lors d'un repas sanguin, la mouche récupère des parasites qui entrent dans l'intestin et commencent le même cycle de différenciation que *T. b. brucei* (Figure 6). Cependant, les parasites ne prennent pas le même chemin et remontent vers le proventricule (Figure 5). Ils deviennent alors non réplicatifs et s'allongent. Ils migrent ensuite au proboscis et non pas dans les glandes salivaires. C'est là que *T. congolense* se différencie en épimastigotes et s'attache à la paroi de chitine du proboscis (Figure 6). Là, les parasites prolifèrent puis deviennent des métacycliques infectieux (Rotureau et Van Den Abbeele 2013). La maturation de *T. congolense* pour le passage à l'hôte mammifère prend en moyenne 15 jours (Leak 1998).

1.1.4.3. *Trypanosoma vivax*

Contrairement à *T. b. brucei* et *T. congolense*, *T. vivax* ne possède pas de forme procyclique. L'existence de l'équivalent d'une forme *stumpy* chez *T. vivax* a été suggérée après observation de morphologies hétérogènes dans le sang (Gardiner 1989). Cette population, dite forme sanguine « tardive », est plus allongée que la forme *slender* et est non répliquative (Shapiro et al. 1984; Gardiner 1989). Une fois ingérés par la mouche lors d'un repas sanguin, les parasites migrent vers le proventricule et la partie antérieure du tube digestif où les trypomastigotes sanguins s'allongent avant de migrer vers le proboscis, où ils se différencient en épimastigotes.

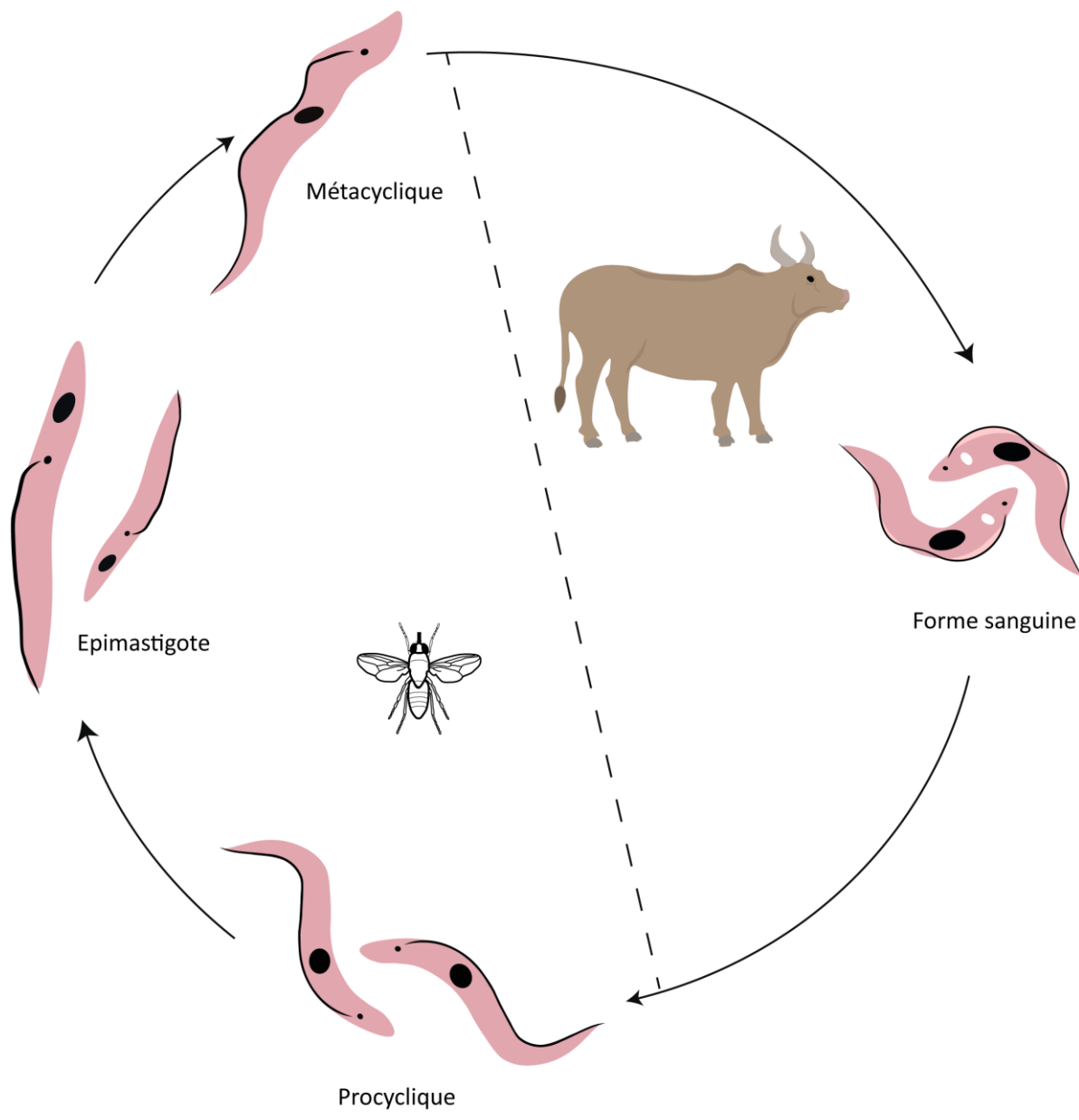


Figure 6 : Cycle évolutif de *Trypanosoma congolense*.
 Réalisé sur Illustrator.

Les parasites colonisent ainsi la paroi du proboscis. Ils finissent par se détacher et se différencient en métacycliques infectieux (Figure 5) (Ooi et al. 2016). Cette simplification du cycle de *T. vivax* explique notamment sa capacité à être transmis mécaniquement par d'autres mouches piqueuses que les glossines, telles que les mouches de la famille des *Tabanidae* ou du genre *Stomoxys*. Le parasite est retrouvé en Amérique Centrale et Amérique du Sud et continue de se répandre dans le monde (Figure 7) (Desquesnes, Gonzatti, et al. 2022). Le développement dans la mouche de formes métacycliques infectieux prend, chez les glossines, entre 3 et 13 jours (Desquesnes, Sazmand, et al. 2022).

1.1.5. Tropismes parasitaires

Le tropisme est la capacité d'un organisme à interagir avec des cellules, tissus ou hôtes spécifiques. Le tropisme d'un parasite influence non seulement sa pathogénicité et les symptômes cliniques qu'il cause à l'hôte, mais aussi sa persistance dans l'hôte, ses chances de transmission et donc son cycle évolutif. Les trypanosomes africains *Salivaria* possèdent des cycles et tropismes d'hôtes distincts et en accord avec ces différences, leur tropisme tissulaire et les symptômes associés à la virulence des parasites leur sont spécifiques (Tableau 1).

1.1.5.1. Trypanosomes humains

Les infections à *T. b. gambiense* représentent 97% des cas de THA. Le parasite cause une forme chronique de la maladie dont l'évolution dure plusieurs années. *T. b. rhodesiense*, responsable des autres cas de THA, cause une forme plus agressive de la maladie qui tue l'hôte en moins de 6 mois. Alors que *T. b. gambiense* réalise principalement un cycle entre l'Homme et la mouche tsétsé, *T. b. rhodesiense* est considéré comme un parasite zoonotique et est retrouvé dans de nombreux animaux sauvages et domestiques qui jouent le rôle de réservoirs (Franco et al. 2020). Sans traitement, la THA est inévitablement mortelle. Lors de la première phase de la maladie, dite hémolympatique, les parasites sont retrouvés dans la circulation sanguine et la peau. La présence des parasites au niveau du derme serait importante dans la transmission du parasite au vecteur (Caljon et al. 2016; Capewell et al. 2016). Un chancre d'inoculation, réaction dermale au site de la pique de la mouche tsétsé, est d'ailleurs l'un des premiers signes de la THA dans le cas d'une infection à *T. b. rhodesiense* (Büscher et al. 2017).

Trypanosoma brucei

Hôtes principaux : Bovins, humains

Vecteurs principaux : *Glossina spp.*

Transmission : Cyclique



Trypanosoma vivax

Hôtes principaux : Bovins et équidés

Vecteurs principaux : *Glossina spp.*, *Stomoxys spp.*, *Tabanids spp.*

Transmission : Cyclique et mécanique



Trypanosoma congolense

Hôtes principaux : Bovins

Vecteurs principaux : *Glossina spp.*

Transmission : Cyclique



Figure 7 : Distribution géographique des trypanosomes *Salivaria*.

Traduit et adapté d'après (Radwanska et al. 2018)

Cette niche leur est également bénéfique au niveau métabolique, puisque les parasites sont capables d'interagir avec les adipocytes du tissu conjonctif. *T. b. brucei*, qui est utilisé en recherche comme modèle de la THA, est d'ailleurs retrouvé dans le tissu adipeux (Caljon et al. 2016; Trindade et al. 2016). La phase hémolympatique est caractérisée par des fièvres, prurits, céphalées, œdèmes et des adénopathies ganglionnaires. Lors de la deuxième phase, appelée stade méningo-encéphalique, qui peut survenir au bout de quelques semaines lors de l'infection à *T. b. rhodesiense*, les parasites passent la barrière hématoencéphalique et envahissent le système nerveux central (SNC) et notamment le fluide cérébrospinal. De nombreux troubles neurologiques apparaissent : perturbation du rythme circadien donnant le nom « maladie du sommeil » à l'infection, mais également des symptômes moteurs et neuropsychiatriques. Le malade finit par tomber dans le coma et mourir (Büscher et al. 2017). Le nombre de cas de THA est en diminution constante depuis plusieurs décennies grâce aux actions menées pour l'élimination des vecteurs et parasites ; depuis 2018, moins de 1000 cas sont rapportés par an et les chiffres continuent de diminuer (Figure 8) ; certains pays ont même complètement éliminé la maladie (Données OMS).

1.1.5.2. Trypanosomes animaux

T. b. brucei, *T. congolense* et *T. vivax* causent tous les trois la Nagana, maladie touchant principalement le bétail, mais pouvant également affecter les animaux domestiques et sauvages. Cependant, ces trois parasites ont des tropismes, morphologies et cycles évolutifs distincts. *T. brucei brucei* est reconnu comme le modèle de la TAA, mais *T. vivax* est le parasite le plus prévalent des trois, et *T. congolense* le plus virulent. Les pertes agricoles en Afrique à cause de la Nagana sont estimées à 4,75 milliards de dollars américains par an, un véritable frein au développement économique du continent (Food and Agriculture Organization of the United Nations 2019). L'infection à *T. b. brucei* suit une évolution similaire à celle de *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* (Silva Pereira et al. 2019). *T. congolense* est capable d'infecter les bovins, ruminants, chevaux, chiens, porcs et sangliers et cause selon les espèces une maladie chronique (bétail) ou rapidement fatale (chiens, chevaux, chèvres) (Silva Pereira et al. 2022). Le parasite adhère à l'endothélium vasculaire de son hôte et reste majoritairement présent dans la circulation sanguine, même s'il est parfois retrouvé dans les tissus (Fiennes 1950; Valli et Forsberg 1979) et au niveau du derme, où le parasite cause des lésions (Emery et Mooloo 1981).

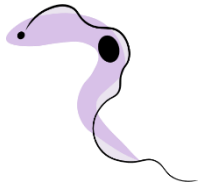


Parasite	 <i>T. b. brucei</i> <i>T. b. gambiense</i> <i>T. b. rhodesiense</i>	 <i>T. congolense</i>	 <i>T. vivax</i>
Hôtes	Humains Primates non humains Bovins Chiens Chevaux	Ruminants Chevaux Porcs Chiens Sangliers	Ruminants Chevaux Camélidés Porcs
Maladie	Nagana (<i>T. b. brucei</i>), Maladie du sommeil (<i>T. b. gambiense</i> et <i>T. b. rhodesiense</i>)	Nagana	
Distribution géographique	Afrique subsaharienne		Afrique subsaharienne, Amérique Centrale et Latine, Iran
Présence dans les vaisseaux sanguins	Extra et intravasculaire	Intravasculaire	
Niches principales caractérisées	Circulation sanguine, tissu adipeux (<i>T. b. brucei</i>), peau, SNC	Circulation sanguine, peau, SNC	
Signes cliniques majeurs	Anémie (TAA), cachexie (TAA), fièvre, prurits, gonflement des ganglions lymphatiques, œdèmes, symptômes neurologiques		

Tableau 1 : Caractéristiques principales des maladies causées par les différentes espèces de trypanosomes africains.

L'attachement des parasites à l'endothélium ou aux cellules sanguines cause des dommages aux vaisseaux sanguins et participe au déclenchement de la réponse immunitaire (Banks 1980). L'anémie est un symptôme majeur de l'infection à *T. congolense* et est probablement due à plusieurs facteurs, dont la sécrétion d'une phospholipase A₂ qui cause la destruction des globules rouges (GR) et l'agrégation plaquettaire (Tizard et Holmes 1976; Tizard et al. 1978; Tizard, Holmes, et Nielsen 1978) et de sialidases qui participent au processus d'érythrophagocytose (Coustou et al. 2012). Des trans-sialidases sécrétées activent également la réponse inflammatoire des cellules endothéliales (Ammar et al. 2013). Les parasites peuvent s'accumuler dans la microcirculation et s'y « séquestrer » (Losos et al. 1973). Dans la microcirculation de l'endothélium cérébral, cette séquestration augmente la sévérité de la maladie par le déclenchement de la réponse immunitaire locale, le recrutement de cytokines et chimiokines et des cellules comme les lymphocytes T CD4⁺. Ces interactions entre les parasites et le système immunitaire de l'hôte causent une trypanosomiase cérébrale, qui a lieu lors de la phase aiguë de la maladie et non pas lors d'une seconde phase comme chez *T. brucei brucei* (Silva Pereira et al. 2022).

T. vivax infecte majoritairement les ruminants, les chevaux, camélidés et porcs. L'infection à *T. vivax* cause des lésions dans de nombreux organes et tissus : cœur, rate, rein, œil, peau, tissu adipeux, SNC, foie, organes reproducteurs, mais le parasite est considéré moins pathogénique que *T. congolense* (Silva Pereira et al. 2019). La première phase de l'infection est caractérisée par une haute parasitémie et une forte anémie qui peut causer la mort de l'hôte. Si l'animal survit, *T. vivax* entre ensuite dans une phase chronique où il interagit avec le système immunitaire mature de l'hôte (Guegan et al. 2013). Les parasites peuvent se disséminer dans la circulation, mais restent confinés au milieu intravasculaire, où ils sont capables d'adhérer à l'endothélium et s'y séquestrer (Silva Pereira et al. 2023). Comme chez *T. congolense*, des trans-sialidases causent une phagocytose des GR, participant à l'anémie observée lors de l'infection (Guegan et al. 2013). À noter que les symptômes diffèrent entre les hôtes naturels comme les chèvres et les modèles non naturels comme la souris (Silva Pereira et al. 2023).

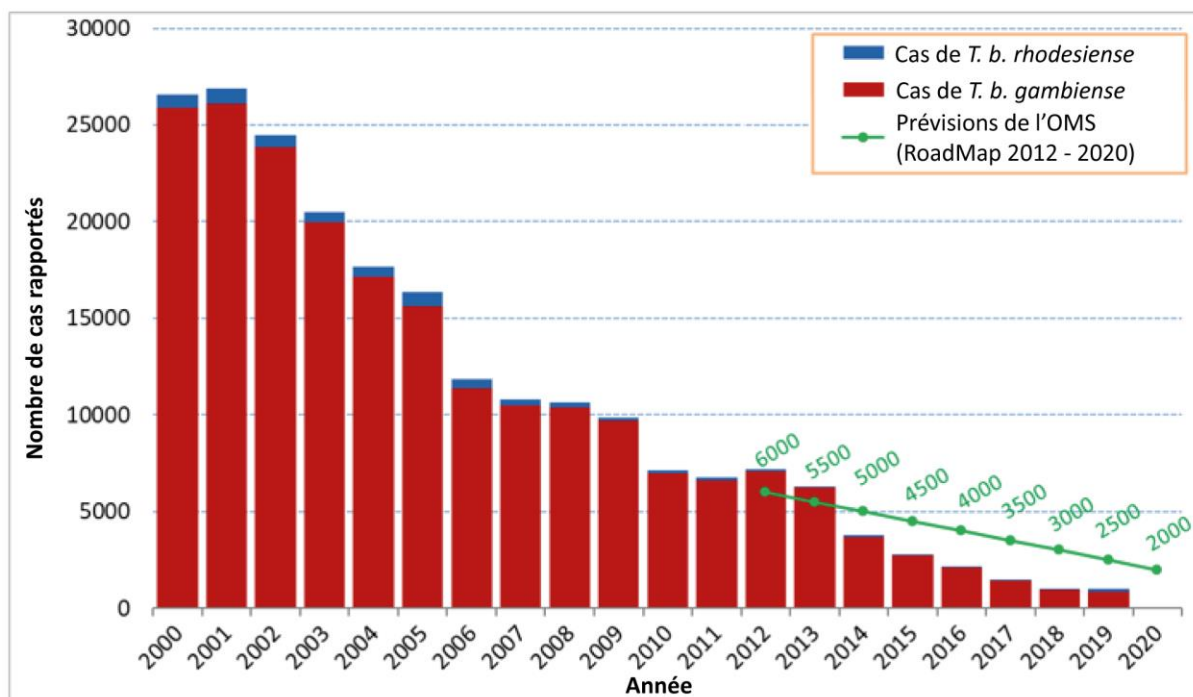


Figure 8 : Cas de trypanosomiasés humaines africaines rapportés entre 2000 et 2020.

Traduit d'après les données de l'OMS du 23 Juin 2020 sur le déclin des cas de maladie du sommeil (www.who.int).

1.1.6. Diagnostics et traitements

1.1.6.1. Méthodes de diagnostic

Les méthodes de diagnostic des TAA et THA sont multiples et varient en termes de sensibilité et spécificité. Les signes cliniques diffèrent peu entre espèces (Tableau 1) et sont souvent confondus, dans le cas des TAA, avec d'autres parasitoses du système sanguin dont les symptômes sont similaires comme la babésiose (*Babesia* spp.) ou la theilériose (*Theileria parva*) (Toukara et al. 2021). Le diagnostic pour les TAA doit ainsi se baser sur d'autres paramètres. On retrouve pour les trypanosomiasés animales trois catégories majeures de diagnostic : la détection par l'observation directe des parasites, le diagnostic moléculaire et la détection immunologique.

Les examens visant la détection des parasites sont basés sur la mise en évidence des parasites dans l'hôte par observation microscopique. Ces techniques sont faciles et rapides à mettre en place et sont peu coûteuses (www.woah.org). La coloration May-Grunwald Giemsa permet notamment de discriminer selon le sous-genre et d'apprécier la morphologie du parasite. Cependant, ces techniques sont très peu sensibles et demandent une concentration de parasites assez élevée. Plus la technique est sensible, plus elle coûte cher et demande du temps et des compétences supplémentaires (Desquesnes, Gonzatti, et al. 2022).

Le diagnostic moléculaire a pour but de détecter la présence de séquences de nucléotides spécifiques d'une espèce de *Trypanosoma*. On retrouve dans ces techniques l'amplification de séquences par PCR (*polymerase chain reaction*) qui est très sensible, mais requiert des équipements et du personnel, et la technique LAMP (*loop-mediated isothermal amplification*), qui est applicable en terrain, moins coûteuse, plus sensible et spécifique que la PCR, mais ne permet pas de diagnostiquer les co-infections et peut donner des résultats faux-positifs en cas de contamination des échantillons (Kuboki et al. 2003; Desquesnes, Gonzatti, et al. 2022).

Enfin, le diagnostic immunologique est basé sur la présence, dans l'hôte, d'antigènes du parasite ou d'anticorps de l'hôte dirigés contre ces antigènes. Le sérodiagnostic, basé sur la présence d'anticorps produits par l'hôte, ne permet pas de conclure sur une infection active ou passée, car ces anticorps peuvent continuer à circuler dans l'hôte plusieurs mois après l'infection. Les tests basés sur les antigènes parasitaires, au contraire, permettent de montrer une infection active.

Trypanosomiasés humaines africaines			
Médicament	Parasite ciblé et stade de la maladie	Voie d'administration	Effets secondaires
Suramine	<i>T. b. rhodesiense</i> Stade 1	Intraveineuse	Réactions néphrotoxiques et allergiques
Mélarsoptol	<i>T. b. rhodesiense</i> Stade 2	Intraveineuse	Syndrome encéphalopathique, malaise, réactions gastro-intestinales et cutanées
Pentamidine	<i>T. b. gambiense</i> Stade 1	Intramusculaire	Hypotension, nausées, azotémie, diabète temporaire
Nifurtimox – Eflornithine NECT (bithérapie)	<i>T. b. gambiense</i> Stade 2	Intraveineuse (Eflornithine) Orale (Nifurtimox)	Douleurs abdominales, nausées, vomissements, céphalée, réactions psychotiques
Fexnidazole	<i>T. b. gambiense</i> Stades 1 et 2	Orale	Vomissements, nausées, céphalées, réactions neuropsychiatriques
Acoziborole		Orale	En phase d'essai clinique
Trypanosomiasés animales africaines			
Molécule	Parasites ciblés	Animaux traités	Voie d'administration
Diminazene acéturate	<i>T. congolense, T. vivax, T. b. brucei</i>	Bétail, moutons, chèvres, chiens	Intramusculaire
Isométamidium chlorure		Bétail, moutons, chèvres, chevaux, chameaux	
Homidium		Bétail, moutons, chèvres, porcs	Intramusculaire (bétail) Intraveineuse (moutons, chèvres, porcs)
Quinapyramine sulfate		Chameaux, chevaux, porcs, chiens	Sous-cutanée
Suramine	<i>T. b. brucei</i>	Chameaux, chevaux	Intraveineuse
Melarsomine		Chameaux, buffles, chèvres, porcs, chevaux, bétail	Intramusculaire

Tableau 2 : Médicaments prescrits lors d'une infection par différents trypanosomes africains.

D'après les lignes directrices provisoires de l'OMS pour le traitement de la trypanosomiase humaine africaine à *T. b. gambiense* d'Août 2019 (trypanosomiasés humaines) et de (Giordani et al. 2016) (trypanosomiasés animales)

On y retrouve notamment les tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Ces tests restent cependant à améliorer, car ils ne permettent pas de discriminer entre les différentes espèces de *Trypanosoma* ou au contraire sont limités à la détection d'une espèce particulière. De plus, certains de ces tests sont coûteux et nécessitent des équipements spécifiques (Toukara et al. 2021). Pour les THA, la confirmation d'une infection à *T. b. gambiense* peut se faire grâce à des tests de diagnostic immunologiques. Il n'existe pas de tests sérologiques disponibles pour *T. b. rhodesiense*, dont le diagnostic repose uniquement sur les symptômes cliniques ou l'observation des parasites à partir des fluides corporels du patient (Priotto et al. 2023).

1.1.6.2. Traitements

Les traitements employés dans le cadre de la THA sont spécifiques à l'espèce et au stade de la maladie. La démarche à employer pour le traitement est dictée et mise à jour par l'OMS, qui fournit les médicaments et coordonne les efforts pour l'élimination de la THA. Actuellement, 6 médicaments font partie des lignes directrices de l'OMS (Tableau 2). La Suramine et le Mélarsoprol sont utilisés contre *T. b. rhodesiense* au premier et second stades de la maladie, respectivement. Ces deux médicaments sont injectés par voie intraveineuse et provoquent des effets secondaires indésirables importants. Le Mélarsoprol est notamment un dérivé de l'arsenic et peut causer des encéphalopathies mortelles. Contre *T. b. gambiense*, c'est la Pentamidine qui est utilisée au premier stade. Dans la seconde phase de la maladie, le Nifurtimox et l'Eflornithine sont généralement utilisés en bithérapie (NECT, *Nifurtimox/Eflornithine combination therapy*). Le Fexinidazole, médicament récemment autorisé dans le cadre du traitement de la THA par *T. b. gambiense*, peut être utilisé dans les deux stades de la maladie (Données OMS, Mesu et al. 2018; Lindner et al. 2020). Actuellement, un nouveau composé, l'Acoziborole, est en phase d'essai clinique (Lindner et al. 2020).

6 médicaments sont également disponibles pour le traitement des TAA (Tableau 2). Ces molécules sont peu efficaces et moins spécifiques puisqu'ils sont tous indiqués lors d'une infection *T. congolense*, *T. vivax* ou *T. brucei brucei* pour un grand nombre d'espèces animales. (Giordani et al. 2016). Toutes ces drogues possèdent un certain degré de toxicité et des résistances apparaissent de plus en plus face à leur utilisation (Kasozi, MacLeod, et Welburn 2023).

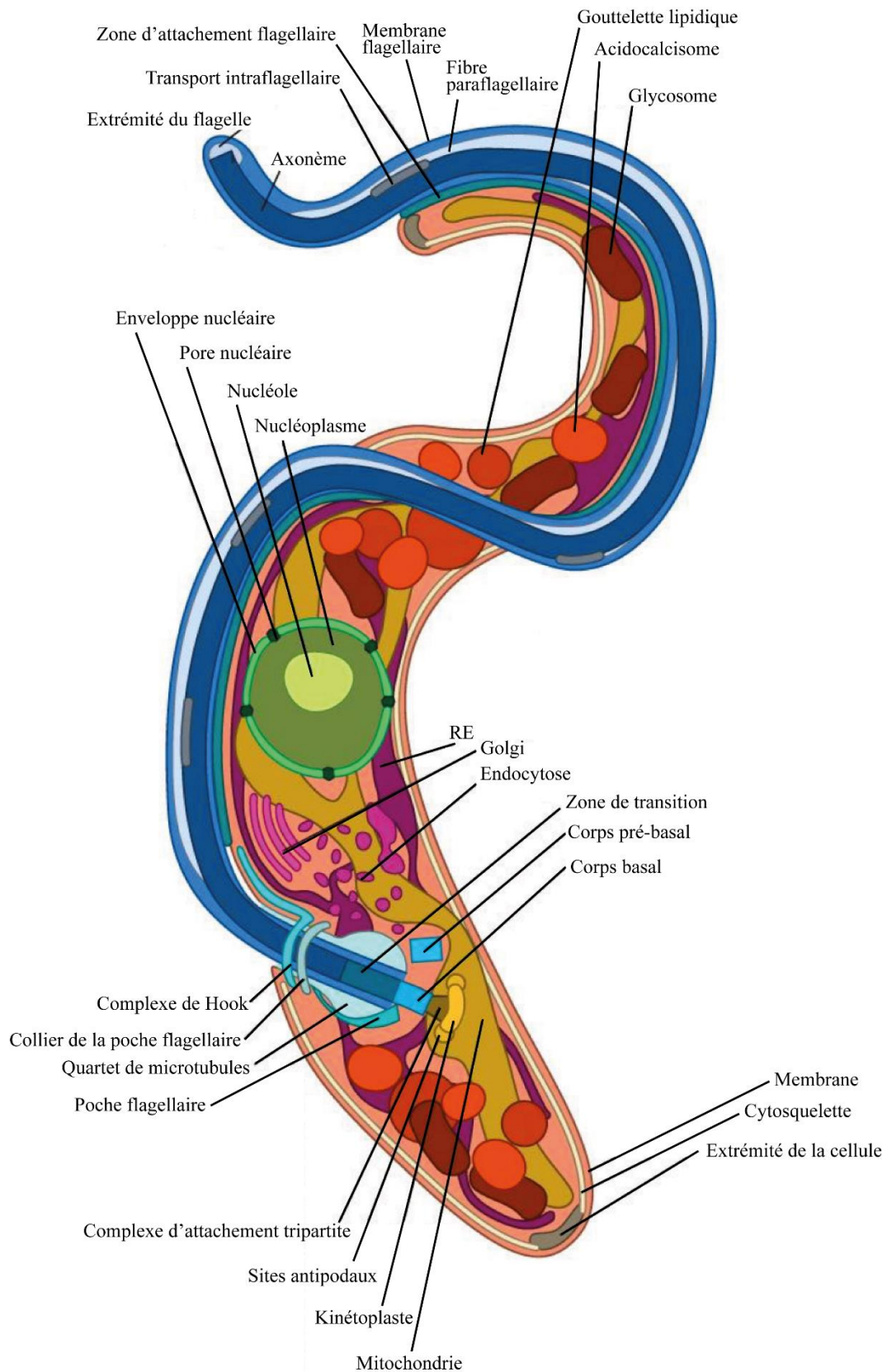


Figure 9 : Schéma de l'architecture cellulaire de *Trypanosoma brucei*.
 RE, réticulum endoplasmique. Traduit d'après (Billington et al. 2023).

Il n'existe à l'heure actuelle pas de vaccin contre les trypanosomes africains, du moins pour leurs hôtes naturels. Un vaccin anti-*T. vivax* basé sur un antigène invariant du flagelle du parasite a cependant généré une protection immunitaire importante dans un modèle murin (Autheman et al. 2021).

1.1.7. Biologie des trypanosomes africains

1.1.7.1. Organisation et caractéristiques cellulaires

T. brucei est un parasite unicellulaire mesurant entre 15 et 25 μm de long et de 2 à 5 μm de large entre la forme sanguine et la forme procyclique. L'intégrité de sa structure cellulaire et la position des organites du parasite sont maintenues tout au long de son cycle évolutif par un cytosquelette microtubulaire hautement polarisé (Robinson et al. 1995; Büscher et al. 2017). Le kinétoplaste, situé du côté postérieur de la cellule, est connecté à un flagelle unique qui est attaché à la membrane plasmique et s'étend sur toute la cellule jusqu'à une extrémité libre au niveau de la partie antérieure du parasite (Figure 9). Ce flagelle confère aux parasites une mobilité et motilité essentielle à leur survie et pathogénicité. Il est constitué de 9 doublets de microtubules qui entourent deux singulets centraux. Le flagelle est ancré au cytoplasme au niveau postérieur *via* le corps basal au niveau d'une zone de transition. La poche flagellaire, où se situe la zone de transition et le début du flagelle, marque le point unique d'endo- et exocytose du parasite. Le flagelle est lié à l'extrémité antérieure de la cellule par la zone d'attachement flagellaire (Langousis et Hill 2014). Le parasite possède des organites habituellement retrouvés chez les autres eucaryotes : réticulum endoplasmique (RE), appareil de Golgi, lysosomes... (Figure 9). Les trypanosomes africains possèdent cependant quelques particularités cellulaires. Les sept premières étapes de la glycolyse se déroulent dans des compartiments apparentés aux péroxysomes appelés glycosomes (Fred R. Opperdoes et Borst 1977). Les parasites possèdent une mitochondrie unique qui s'étend de la partie postérieure à la partie antérieure de la cellule et dont la structure change au cours du cycle évolutif. Chez les parasites procycliques, la mitochondrie est très développée et réticulée pour répondre aux besoins énergétiques des cellules. Chez les formes sanguines, elle est tubulaire et son activité est réprimée (Zíková 2022). La membrane plasmique des parasites est couverte de protéines spécifiques à la forme parasitaire et adaptées à la survie dans l'hôte (Vassella et al. 2009).

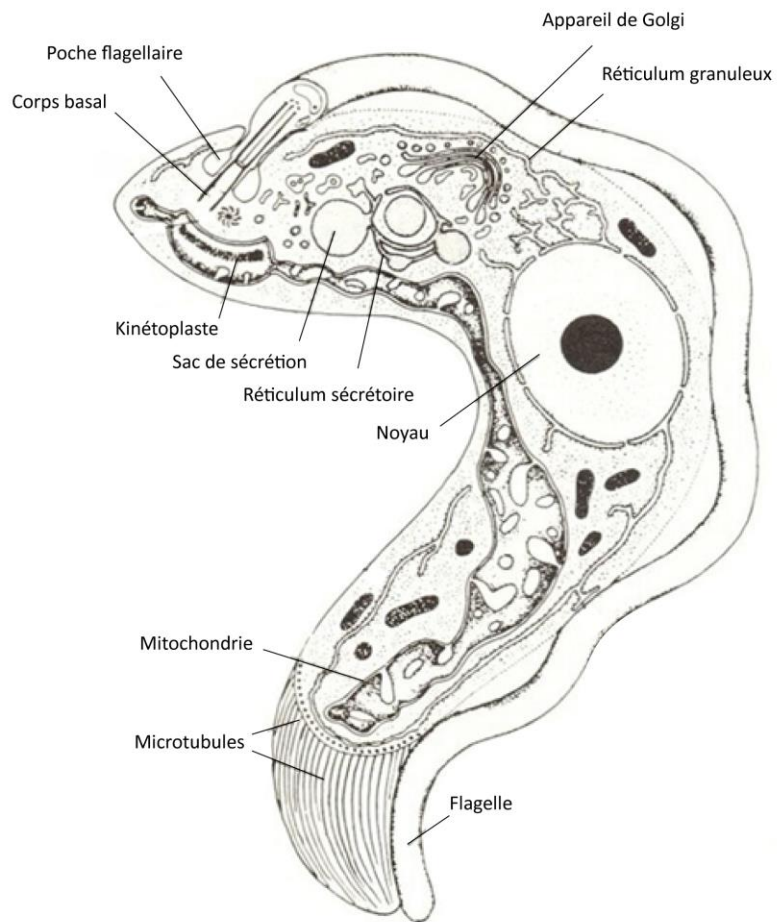


Figure 10 : Schéma de l'architecture cellulaire de *Trypanosoma congolense* forme sanguine.

Taduit et adapté d'après (Roberts, Schmidt, et John 2009).

T. congolense possède une morphologie très similaire, mais avec quelques particularités (Figure 10). Légèrement plus petit que *T. brucei*, le parasite possède une membrane ondulante moins développée et n'a pas de flagelle libre, limitant ses déplacements (Giordani et al. 2016). Dans le sang, le parasite s'attache aux érythrocytes circulants et aux cellules endothéliales *via* le flagelle (Silva Pereira et al. 2022).

1.1.7.2. Le génome

Les trypanosomes africains sont des organismes diploïdes possédant un génome réparti entre le noyau et le kinétoplaste, qui contient l'ADN mitochondrial. Séquencé en 2005, le génome nucléaire de *T. brucei*, d'une taille de 26 Mb (Mégabases), contient 9 068 gènes prédits comprenant 904 pseudo-gènes et environ 1 700 gènes spécifiques au parasite (Berriman et al. 2005). On retrouve dans ce génome trois classes de chromosomes observables par séparation sur gel d'électrophorèse à champs pulsés : les mégachromosomes, au nombre de 11, qui ont une taille comprise entre 1 et 6 Mb, des chromosomes intermédiaires entre 200 et 900 kb et une centaine de minichromosomes dont la taille varie entre 50 et 150 kb. La ploïdie de ces deux dernières catégories de chromosomes est questionnée. La grande majorité des gènes transcrits se trouve sur les mégachromosomes, mais les chromosomes intermédiaires et les minichromosomes possèdent des sites d'expression des VSG (*variable surface glycoprotein*) (Melville et al. 1998; Berriman et al. 2005). Les gènes forment de longs clusters non-chevauchants transcrits en polycistrons ; l'expression des gènes est donc régulée au niveau post-transcriptionnel par les systèmes de *trans*-épissage et de polyadénylation : une séquence appelée *spliced leader* en 5' et une queue polyA en 3' sont ajoutées à l'ARNm, ce qui permet la formation d'ARNm monocistroniques matures (Matthews, Tschudi, et Ullu 1994).

Le génome mitochondrial (9 Mb) est retrouvé dans le kinétoplaste. Il forme un réseau composé de milliers de minicercles de 1 kb et une douzaine de maxicercles d'une taille d'environ 20 kb. Les maxicercles possèdent des structures et fonctions similaires à l'ADN mitochondrial retrouvé chez de nombreuses espèces eucaryotes, dont des gènes codants pour des ARN ribosomiaux et des sous-unités de protéines mitochondriales impliquées dans la chaîne respiratoire (Rohrer et al. 1987). L'ARNm mitochondrial issu des transcrits des maxicercles n'est cependant pas fonctionnel et subit de nombreuses modifications post-transcriptionnelles par un système appelé l'édition d'ARN.

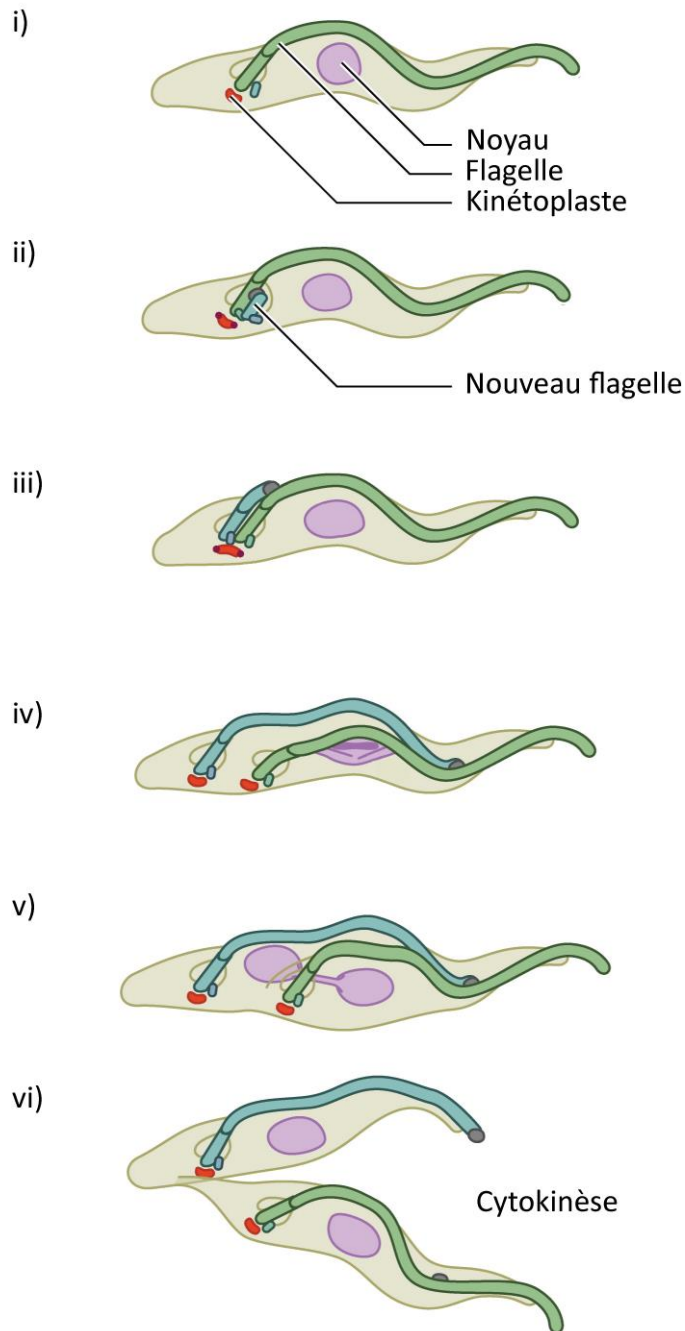


Figure 11 : Division cellulaire chez la forme procyclique de *Trypanosoma brucei*.

i) Le parasite possède un kinétoplaste et un noyau (1K1N) en phase G1. ii, iii) un nouveau corps basal et flagelle émergent, avec élongation du kinétoplaste qui finit par iv) se diviser lors de la séparation des corps basaux et des flagelles (2K1N). v) Le noyau entre en phase de mitose et se divise (2K2N). vi) la cytokinèse permet la formation de deux cellules filles 1K1N. Traduit et adapté d'après (Wheeler, Gull, et Sunter 2019).

La machinerie de l'édition vise à produire des transcrits différents de la séquence du gène. Ces modifications peuvent être des insertions, remplacements ou délétions de bases dans le transcrit d'ARNm. Le phénomène a été découvert en 1986 chez les trypanosomes quand une équipe découvre chez *T. brucei* et *Crithidia fasciculata*, un parasite d'insectes de la famille des *Trypanosomatidae*, un changement de cadre de lecture entre la séquence ADN du gène mitochondrial *coxII* et la séquence protéique. Ils démontrent alors l'insertion de quatre nucléotides d'uridine dans le transcrit d'ARNm de *coxII* et prouvent l'existence de l'édition post-transcriptionnelle des ARNm mitochondriaux (Benne et al. 1986). Cette modification, essentielle à la fonctionnalité des ARNm mitochondriaux, est contrôlée par des guides ARN (ARNg) produits par les minicercles (Liu et al. 2005).

Le génome de *T. congolense* est un peu plus conséquent que celui de *T. brucei*, avec une taille totale de 41 Mb pour 11 792 gènes prédits répartis sur 11 mégachromosomes (Jackson et al. 2012) (www.tritrypdb.org).

1.1.7.3. Cycle cellulaire

T. brucei possède un cycle de fission binaire aboutissant à la formation de deux cellules filles identiques (Figure 11). Le cycle est réparti en 4 phases : G0/G1, S, G2, M et commence au stade G0/G1, où le parasite possède un kinétoplaste K et un noyau N, annoté 1K1N. Le cycle de multiplication cellulaire commence par la maturation du corps pré-basal et la rotation du corps basal, duquel émerge un nouveau flagelle. Pendant la formation du flagelle, le kinétoplaste s'allonge et finit par se diviser (phase S) lors de la séparation des deux corps basaux et des flagelles. Les cellules présentent alors un phénotype 2K1N. La réplication du noyau (phase S) est légèrement décalée et plus longue de celle du kinétoplaste, qui entre en phase G2. Pendant la phase G2 du noyau, les kinétoplastes, chacun attachés à un corps basal, sont séparés physiquement. Le noyau entre ensuite en mitose (phase M) et la division nucléaire marque le phénotype 2K2N. Enfin, la cytokinèse se fait en suivant un plan de clivage sur l'axe longitudinal du parasite et commence au niveau de la partie antérieure, séparant les deux flagelles (Figure 11) (McKean 2003). La forme *stumpy* est caractérisée par un arrêt au stade G0.

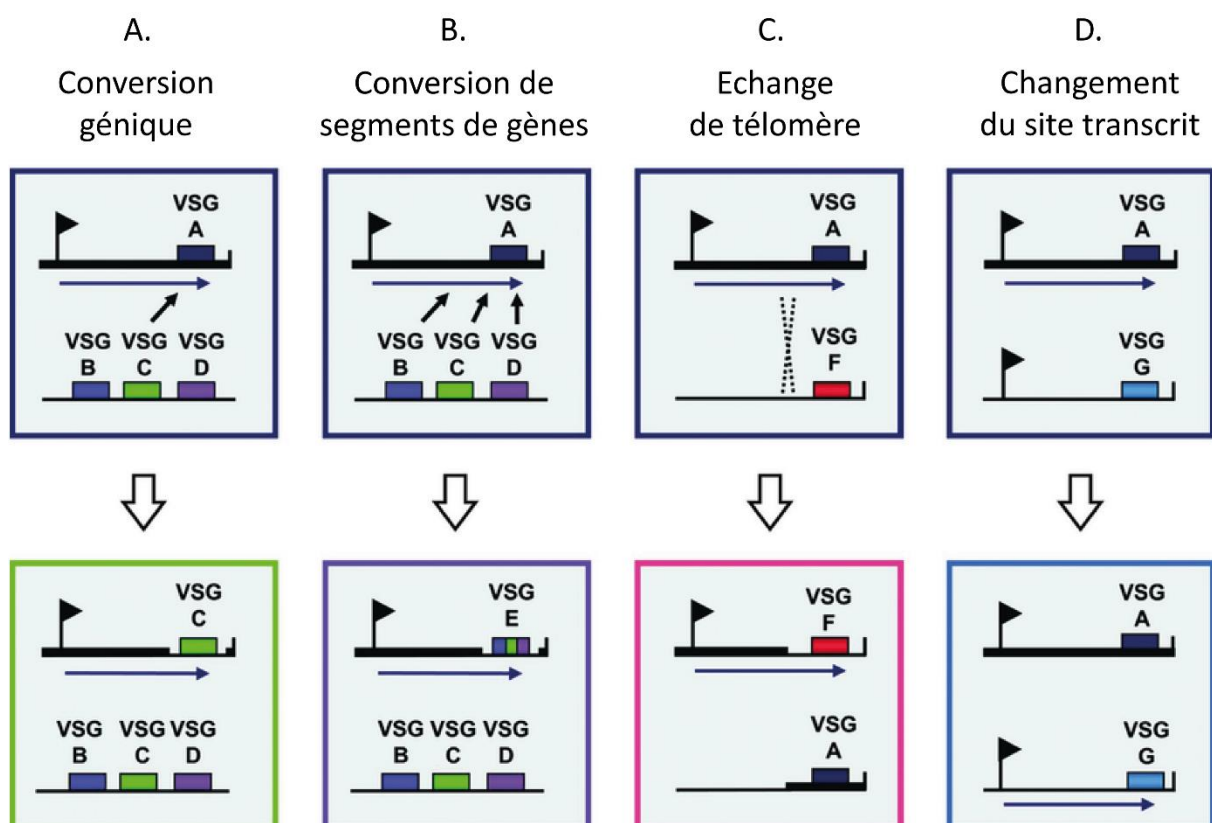


Figure 12 : Mécanismes de modification des VSG chez *Trypanosoma brucei*.

Le promoteur de l'unique site d'expression actif est représenté par un drapeau, et la transcription par une flèche. **A.** La conversion génique implique la copie d'un gène inactif dans le site d'expression actif, permettant sa transcription. **B.** La conversion par segments de gènes permet la recombinaison de morceaux de différents gènes ou pseudogènes de VSG, formant des VSG mosaïques. **C.** L'échange télomérique permet l'insertion d'un télomère inactif dans le site d'expression actif, et déplace le gène VSG actif dans un télomère inactif. **D.** La modification transcriptionnelle active un site d'expression différent. Traduit d'après (Vink, Rudenko, et Seifert 2012).

1.1.7.4. Les protéines de surface

Les parasites expriment au cours de leur cycle un manteau de protéines variables forme-spécifique. Chez la forme sanguine, les VSG sont des homodimères de 2 sous-unités de 50 à 60 kDa selon les espèces, formant un manteau d'une épaisseur de 15 nm à la surface du parasite agissant comme une barrière physique entre le parasite et le milieu extracellulaire de l'hôte (Schwede et al. 2015). Le génome de *T. brucei* est composé de plus de 2 500 gènes codant pour des VSG, dont 80% sont des pseudogènes (Cross, Kim, et Wickstead 2014). 10^7 copies identiques de la glycoprotéine recouvrent le parasite, correspondant à 10% des protéines totales exprimées (Turner et al. 1985). L'expression des VSG est essentielle à la survie des parasites, qui sont autrement bloqués dans leur cycle cellulaire (Shedder et al. 2005). Les gènes codant pour les VSG sont retrouvés dans 15 sites d'expression, dont un seul est actif à la fois et séparé physiquement des autres dans un corps extra-nucléolaire contenant une ARN polymérase I spécifique à la forme sanguine du parasite, permettant l'expression d'une VSG unique (Navarro et Gull 2001). Les parasites sont capables de modifier la VSG exprimée à l'aide de plusieurs mécanismes (Figure 12). Le premier mécanisme et le plus important est la conversion génique, qui permet le remplacement de la VSG actif par recombinaison homologue. Le second mécanisme est la conversion de segments de gènes de VSG, qui permet de former des VSG « mosaïques ». Les deux derniers mécanismes, qui sont moins fréquents, sont l'échange de télomère et le changement du site d'expression transcrit (Aitcheson et al. 2005). Les parasites sous forme métacyclique expriment également des VSG spécifiques à cette forme (Hutchinson, Glover, et Horn 2016).

Lors du passage dans la mouche, la synthèse de VSG est rapidement réprimée et au bout de quelques heures, les parasites sont recouverts d'un nouveau manteau composé de protéines appelées procyclines (Richardson et al. 1988). Ces protéines possèdent dans leur partie C-terminale deux types de répétitions d'acides aminés. L'isoforme EP contient 22 à 30 répétitions Glu-Pro et l'isoforme GPEET 6 répétitions Gly-Pro-Glu-Glu-Thr suivis de 3 répétitions de type EP (Mowatt et Clayton 1987; Roditi, Carrington, et Turner 1987; Mowatt, Wisdom, et Clayton 1989). Si les deux isoformes sont retrouvées chez les procycliques nouvellement différenciés, seule EP est exprimée au bout de 7 jours (Vassella et al. 2000). Le manteau est composé d'environ $2,2 \cdot 10^6$ procyclines et contrairement aux VSG, le nombre de gènes codant pour les procyclines est très limité (Acosta-Serrano et al. 1999).

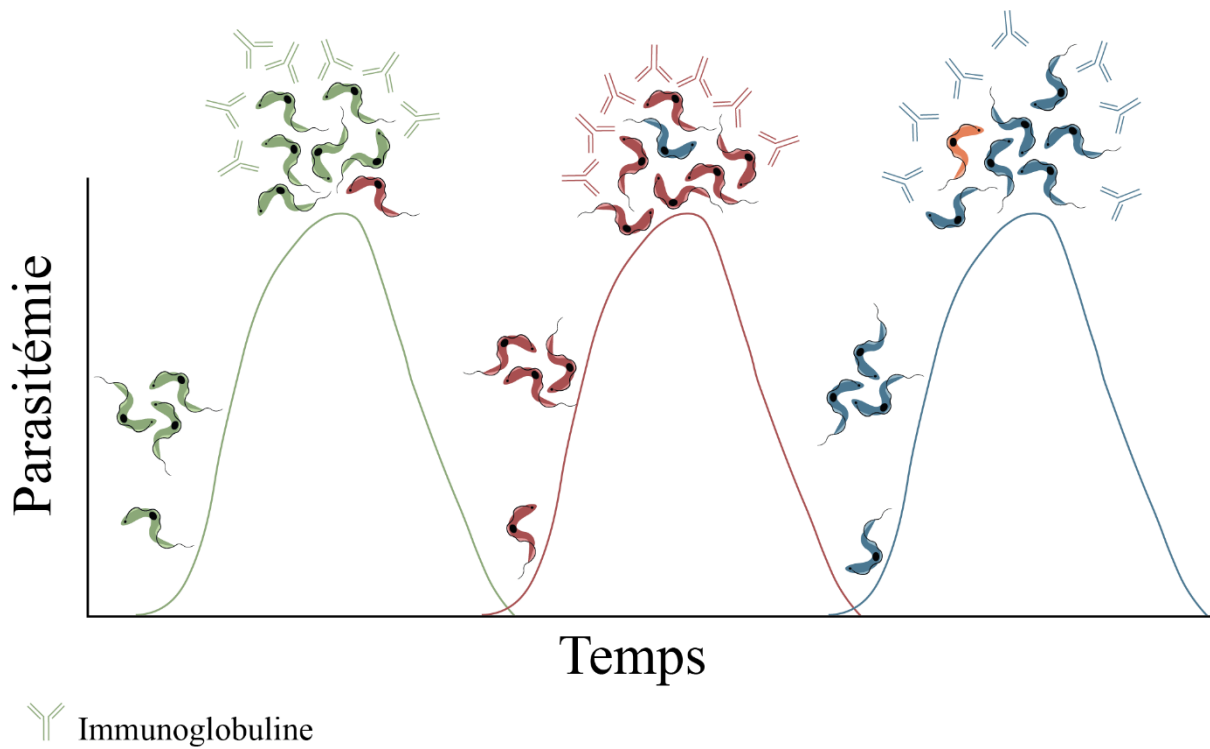


Figure 13 : La variation antigénique chez les trypanosomes africains.

Les trypanosomes expriment une VSG majoritaire à un temps T (trypanosomes verts). Le système immunitaire reconnaît et développe une réponse immunitaire et des immunoglobulines spécifiques contre ces VSG, permettant l'élimination des parasites et une diminution de la parasitémie. Les populations exprimant des VSG minoritaires (trypanosome rouge) prolifèrent ; ils sont à leur tour reconnus par le système immunitaire qui les élimine. Une nouvelle population minoritaire (trypanosome bleu) se multiplie à son tour, et ainsi de suite, créant des « vagues » de parasitémie. Réalisé sur Illustrator.

Ces protéines ne sont pas essentielles à *T. brucei* qui peut réaliser son cycle dans la mouche sans le manteau de procyclines, mais les parasites atteignent les glandes salivaires avec une plus faible prévalence (Vassella et al. 2009).

Les VSG et les procyclines sont fixées à la membrane par une ancre de glycosylphosphatidylinosol (GPI) insérée dans le feuillet externe de la membrane plasmique du parasite. Les VSG sont d'ailleurs les premières protéines dont la structure de l'ancre GPI a été résolue (Ferguson et al. 1988). Les ancres GPI sont produites dans le RE et fixées à la partie C-terminale des protéines pendant leur traduction. Elles sont constituées, chez les procycliques et formes sanguines, d'un squelette de phosphatidylinositol lié à de l'éthanolamine phosphate et des sucres (Lillico et al. 2003). Cependant, la composition en acide gras des ancres GPI diffère selon la forme parasitaire : l'ancre des parasites procycliques est constituée d'acide palmitique (C16:0) et d'acide stéarique (C18:0) (Field, Menon, et Cross 1991) tandis que l'ancre GPI des VSG est uniquement composée d'acide myristique (C14:0) (Ferguson et Cross 1984; Ferguson, Low, et Cross 1985).

1.1.7.5. La variation antigénique

En tant que parasites extracellulaires sanguicoles, les trypanosomes africains sont directement exposés au système immunitaire de leurs hôtes. La capacité des trypanosomes africains à modifier leur manteau de VSG, phénomène appelé variation antigénique, est un des éléments clés de la mise en place d'une infection chez l'hôte mammifère (Aitcheson et al. 2005). Les VSG sont fortement immunogéniques et peuvent être ainsi reconnues par le système immunitaire de l'hôte infecté, qui produit alors des immunoglobulines (Ig) dans le but de les éliminer. Si la majorité d'une population parasitaire exprime la même VSG à sa surface, quelques parasites expriment d'autres variants contre lesquels le système immunitaire n'a pas développé de défense. Ainsi, lorsque les parasites exprimant la VSG majoritaire sont éliminés par l'hôte, les populations minoritaires continuent de se multiplier, causant une nouvelle hausse de la parasitémie. En réponse, le système immunitaire continue de produire une réponse adaptée au nouveau manteau de VSG majoritaire, permettant la lyse des parasites l'exprimant, suivi de la croissance des populations minoritaires et créant des vagues de parasitémie (Figure 13) (Hall, Wang, et Barry 2013). De plus, quel que soit la VSG exprimée, le manteau empêche l'accès du système immunitaire aux protéines de surface invariables (Schwede et al. 2015).

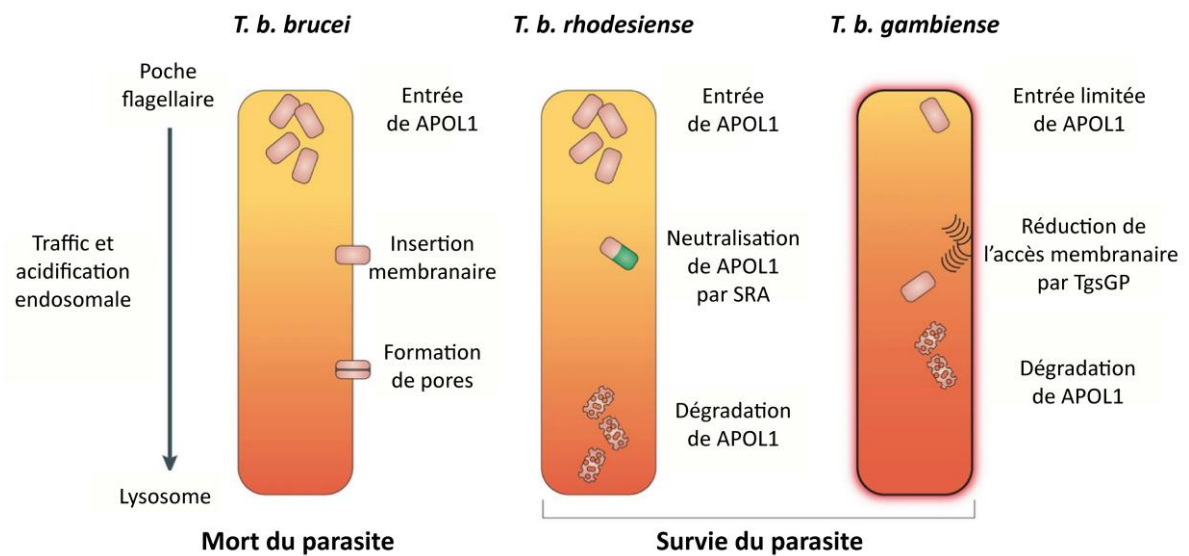


Figure 14 : La réponse à APOL1 chez *Trypanosoma brucei* sous-espèces *brucei*, *rhodesiense* et *gambiense*.

La lipoprotéine primate APOL1 dans les complexes TLF-1 et TLF-2 entre dans *T. brucei*. Chez *T. b. brucei*, APOL1 s'insère dans la membrane endosomale et forme des pores qui entraîne la mort du parasite. Chez *T. b. rhodesiense*, APOL1 interagit avec la protéine SRA et permet sa dégradation. Chez *T. b. gambiense*, l'entrée d'APOL1 est limitée et la présence de la protéine TgsGP empêche l'accès de la lipoprotéine aux membranes parasitaires. Traduit d'après (Pays et al. 2014).

Des études comparatives du répertoire des VSG chez les trypanosomes africains montrent des fréquences de recombinaison différentes entre les espèces ; *T. congolense* possède une fréquence de recombinaison de ses VSG comparable à *T. brucei* mais bien plus importante que celle de *T. vivax* (Magez et al. 2021)

1.1.7.6. Les facteurs trypanolytiques

Bien que génétiquement presque identique à *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei* est incapable d'infecter l'Homme. Cette différence est due à la présence, dans le sérum humain, de la protéine spécifique des primates APOL1 (apolipoprotéine 1). Cette protéine fait partie avec HRP (*haptoglobin-related protein*) de deux complexes composés de lipoprotéines de haute densité (HDL, *high density lipoprotein*) appelés TLF-1 et TLF-2 (*trypanolytic factor 1* et 2) qui confèrent aux humains et plus généralement aux primates une résistance à de nombreuses espèces de trypanosomes (Wheeler 2010). HRP associé à de l'hémoglobine interagit avec le récepteur parasitaire TbHpHbR et permet l'entrée de TLF-1 dans la cellule (Vanhollebeke et al. 2008). Le récepteur de TLF-2 est inconnu et l'entrée du complexe dans la cellule est indépendante de HRP (Capewell et al. 2015). Dans la cellule, APOL1 induit la formation de pores dans le système endosomal des trypanosomes sensibles comme *T. b. brucei*, *T. congolense* ou *T. vivax* et cause la mort cellulaire (Figure 14) (Pérez-Morga et al. 2005). En revanche, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* possèdent des gènes spécifiques leur permettant de résister aux facteurs trypanolytiques et ainsi d'infecter l'Homme.

Chez *T. b. rhodesiense*, un VSG tronqué appelé SRA (*serum resistance associated gene*) est retrouvé dans le lysosome du parasite (De Greef et al. 1989). SRA interagit avec APOL1 pour neutraliser son activité toxique. L'introduction du gène SRA dans le génome de *T. b. brucei* suffit à le rendre résistant aux facteurs trypanolytiques (Figure 14) (Xong et al. 1998). La résistance à la toxicité d'APOL1 chez *T. b. gambiense* est due à la protéine TgsGP (*T. b. gambiense-specific glycoprotein*) qui, comme le SRA, est un VSG tronqué retrouvé dans le lysosome du parasite. TgsGP augmente la rigidité de la membrane lysosomale du parasite lors de l'interaction avec des lipides de l'hôte, ce qui limite l'interaction d'APOL1 avec les membranes (Figure 14) (Uzureau et al. 2013). La transfection de TgsGP chez *T. b. brucei* ne suffit pas à conférer la résistance aux TLF (Berberof, Pérez-Morga, et Pays 2001). De plus, l'internalisation d'APOL1 dans les lysosomes ne tue pas *T. b. gambiense*, supposant l'existence d'autres mécanismes dans la résistance aux TLF chez le parasite.

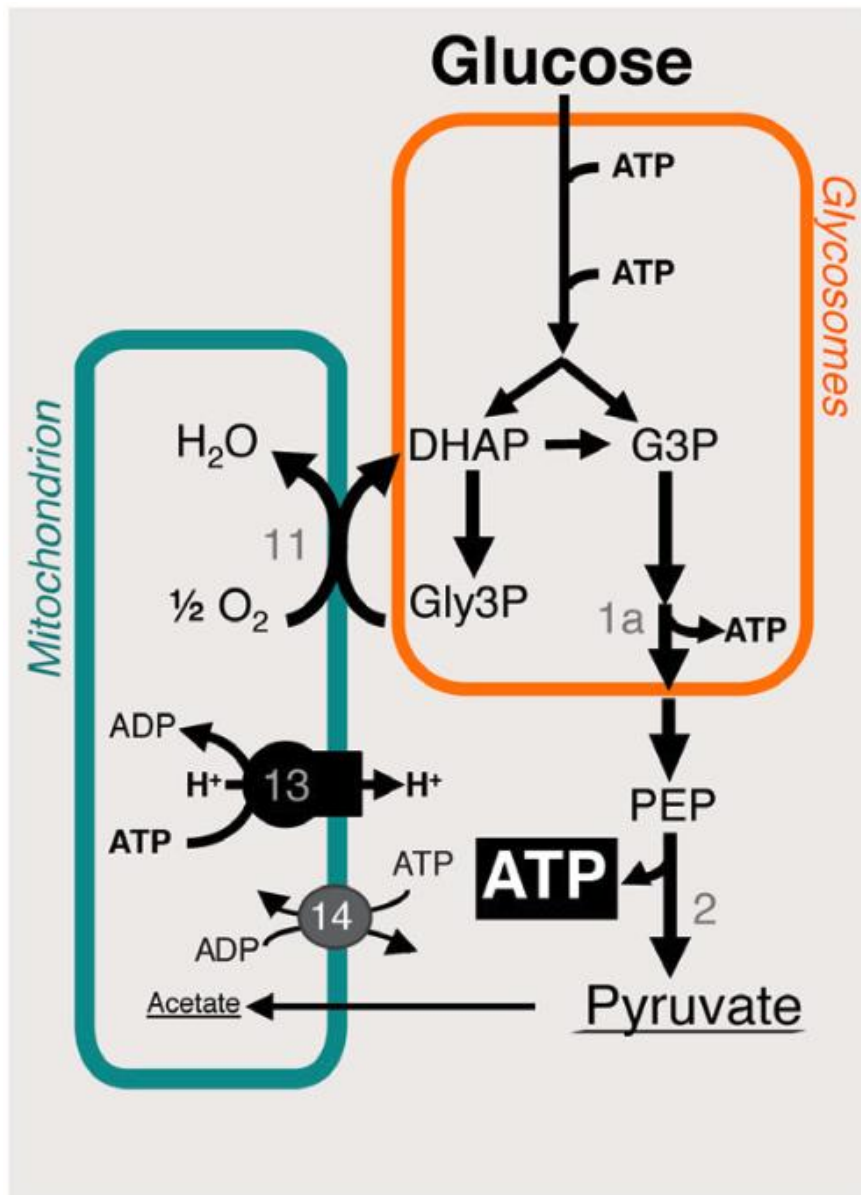


Figure 15 : La production d'ATP chez la forme sanguine de *Trypanosoma brucei*.

Les produits finaux de la dégradation du glucose sont surlignés. 1a, phosphoglycérate kinase glycosomale ; 2, pyruvate kinase ; 11, oxydase alternative du trypanosome (TAO) ; 13, F_0F_1 -ATP synthase ; 14, échangeur ADP/ATP mitochondrial. DHAP, dihydroxyacétone phosphate ; G3P, glycéraldéhyde 3-phosphate ; Gly3P, glycérol-3-phosphate ; PEP, phosphoénolpyruvate (Smith et al. 2017).

Le polymorphisme du récepteur HpHbR, qui limiterait l'entrée d'APOL1, et l'action de cystéine peptidases contre la lipoprotéine ont été proposés comme facteurs de résistance chez le parasite (Capewell et al. 2011; Uzureau et al. 2013).

1.1.7.7. Le modèle d'étude *Trypanosoma brucei*

Les actions de santé publique menées contre *T. brucei* et son vecteur ainsi que le développement de nouveaux médicaments contre la THA ont permis de diminuer le nombre de cas et en conséquence le besoin d'étudier le parasite en tant que pathogène. Cependant, *T. brucei* a fait ses preuves en tant que modèle expérimental en biologie cellulaire et moléculaire, notamment par ses nombreux avantages : i) un génome entièrement séquencé (Berriman et al. 2005) et accessible dans la banque de données TriTrypDB (www.tritrypdb.org), ii) la possibilité de cultiver des trypanosomes non-infectieux pour l'Homme (*T. brucei* sous-espèce *brucei*) sous forme procyclique et sanguine en laboratoire en grande quantité et de iii) reproduire une partie du cycle évolutif *in vitro* et le cycle entier *in vivo* par infection d'insectes et de mammifères, et enfin iv) l'application des principales techniques de biologie moléculaire comme la modification précise des génomes par le mécanisme d'ARN interférence (ARNi), découvert chez *T. brucei* en 1998 (Ngô et al. 1998), quelques mois après la découverte du phénomène chez *C. elegans* (Fire et al. 1998) et plus récemment par la technique CRISPR/CAS9.

1.1.7.8. Le métabolisme énergétique

1.1.7.8.1. Chez la forme sanguine

Avec une concentration de 5 mM dans le sang des mammifères, le glucose est la source primaire de carbone de *T. brucei* pour sa production d'ATP. Les parasites incorporent le glucose dans les glycosomes, où sont retrouvées les 7 premières enzymes de la glycolyse. Le glucose y est ainsi converti en 3-phosphoglycérate (3-PGA) (Figure 15). Il n'y a pas de production nette d'ATP dans les glycosomes, où la consommation est égale à la production (Figure 15). L'étape 6 de la glycolyse converti le dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate (Gly3P) et du NADH qui doit être réoxydé en NAD⁺ afin de maintenir la balance redox du compartiment ; cet équilibre est permis par un système de navette entre les glycosomes et la mitochondrie, constitué du Gly3P et du DHAP (Figure 15).

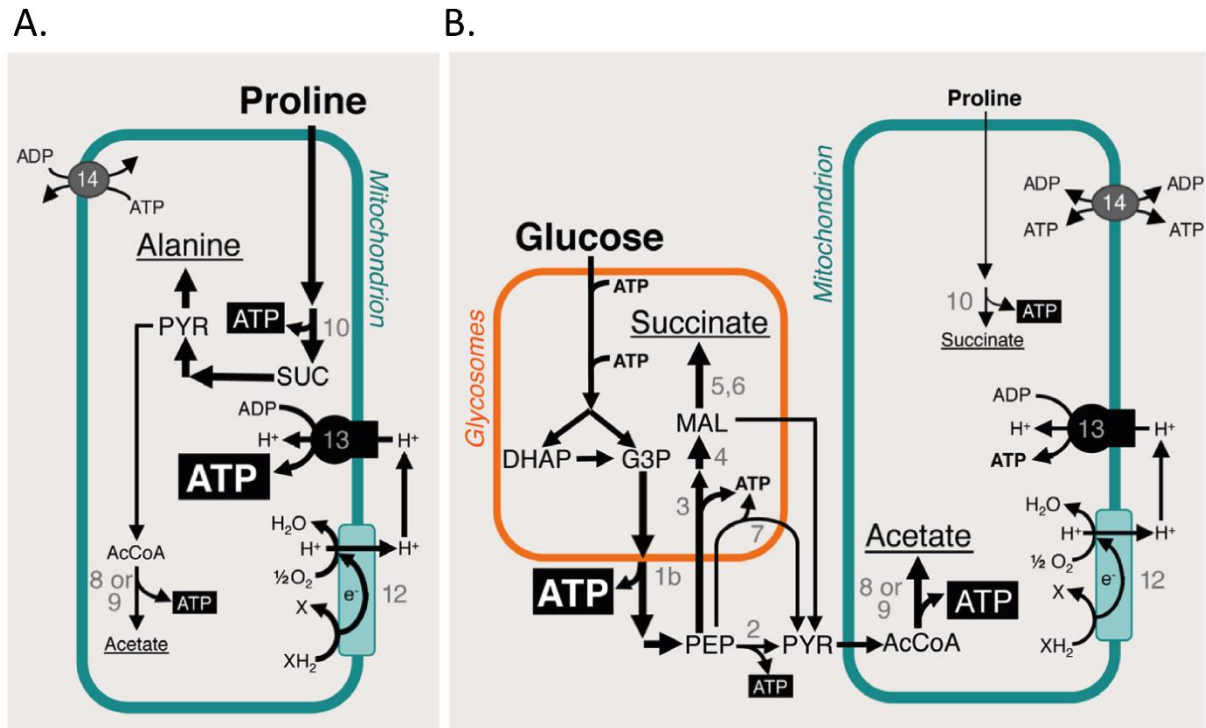


Figure 16 : La production d'ATP chez les formes procycliques de *Trypanosoma brucei* en absence ou présence de glucose.

Les produits finaux excrétés issus des métabolismes sont surlignés. **A.** En absence de glucose, la proline est la principale source d'énergie. **B.** En présence de glucose et de proline, les parasites utilisent préférentiellement le glucose pour la production d'ATP. 1b, phosphoglycérate kinase cytosolique ; 2, pyruvate kinase ; 3, phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) ; 4, malate déshydrogénase glycosomale ; 5, fumarase cytosolique ; 6, fumarate réductase NADH-dépendante glycosomale ; 7, pyruvate phosphate dikinase (PPDK) ; 8, acétate:succinate coenzyme A-transférèse (ASCT) ; 9, acétyl-coenzyme A thioestérèse ; 10, succinyl-coenzyme A synthétèse ; 11, oxydase alternative du trypanosome (TAO) ; 12, chaîne respiratoire ; 13, ATP synthase F_0-F_1 ; 14, échangeur ADP/ATP mitochondrial. PYR, pyruvate ; SUC, succinate ; AcCoA, acétyl-coenzyme A ; MAL, malate ; G3P, glyceraldehyde-3-phosphate ; DHAP, dihydroxyacétone phosphate (Smith et al. 2017)

Le 3-PGA sort des glycosomes pour se retrouver dans le cytosol où ont lieu les 3 dernières étapes de la glycolyse permettant la production de 2 molécules d'ATP et du produit final de la voie, le pyruvate (Figure 15) (Opperdoes 1987; Bringaud, Rivière, et Coustou 2006). La majorité du pyruvate est excrétée hors de la cellule, mais une faible proportion entre dans la mitochondrie pour la synthèse d'acétyl-CoA, qui intègre le cycle de Krebs, ou d'acétate, qui entre dans la biosynthèse des acides gras (Mazet et al. 2013). La génération d'ATP chez les formes sanguines est donc majoritairement dépendante des glycosomes, notamment à cause de l'absence, dans la mitochondrie peu active du parasite, de plusieurs complexes de la chaîne de transport des électrons. En conséquence, l'ATP ne peut pas être produit par la phosphorylation oxydative (Taleva et al. 2023). Le potentiel membranaire mitochondrial est maintenu par une ATP synthase qui opère en sens inverse ; l'enzyme hydrolyse l'ATP et pompe des protons vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Figure 15) (Schnauffer et al. 2005).

1.1.7.8.2. Chez la forme procyclique

L'intestin de la mouche tsétsé est pauvre en glucose, mais riche en acides aminés comme la proline, qui représente la principale source d'énergie des cellules musculaires impliquées dans le vol chez l'insecte (Bursell et al. 1973; Balogun 1974). Les parasites utilisent ainsi les acides aminés comme sources de carbone. La proline, source majoritaire, est importée dans la mitochondrie pour former du glutamate, qui est ensuite métabolisé en α -cétoglutarate qui entre dans le cycle de Krebs (Figure 16A) (Lamour et al. 2005). Lors du cycle, les nombreux cofacteurs réduits produits sont réoxydés par phosphorylation oxydative dans la chaîne respiratoire. De plus, l'ATP synthase F_0-F_1 phosphoryle l'ADP pour produire de l'ATP (Coustou et al. 2003). Lors du métabolisme de la proline, les produits finaux excrétés sont l'alanine, le succinate et l'acétate. Les parasites sont également capables de cataboliser la thréonine, acide aminé principal pour la production d'acétate, précurseur essentiel pour la biosynthèse des lipides. En effet, l'acétate est produit dans la mitochondrie et transféré dans le cytosol où il est reconverti en acétyl-CoA, qui entre ensuite dans les voies de biosynthèse des lipides (Figure 16) (Rivière et al. 2009; Millerioux et al. 2013; 2018). Cependant, en présence de glucose *in vitro*, les parasites sont capables d'adapter leur métabolisme et l'utilisent même préférentiellement. Dans ces conditions, à la différence des formes sanguines, le pyruvate n'est pas le produit final de la glycolyse.

Le 3-PGA est converti en phosphoénolpyruvate (PEP), qui peut retourner dans les glycosomes pour former du succinate (Besteiro et al. 2002), ou être transformé en pyruvate qui est transporté dans la mitochondrie pour former de l'acétyl-CoA puis de l'acétate (Figure 16) (Van Hellemond, Opperdoes, et Tielens 1998). Ainsi, le succinate et l'acétate sont les deux produits finaux excrétés. Dans ces conditions, le métabolisme du glucose est suffisant pour alimenter la voie de biosynthèse des lipides (Lamour et al. 2005; Millerioux et al. 2013).

1.1.7.8.3. Le métabolisme lipidique

Les lipides sont des nutriments essentiels à la survie et la croissance des parasites, et ce tout au long de leur cycle évolutif. Pour répondre aux besoins lipidiques des cellules, les parasites ont deux choix : produire *de novo* des acides gras, un processus demandant beaucoup d'énergie à la cellule, ou les récupérer à partir de son hôte (Parreira de Aquino et al. 2021). La forme sanguine de *T. brucei* utilise majoritairement la seconde option : les parasites endocytent les lipoprotéines présentes dans la circulation sanguine, et leur présence dans le milieu de culture permet une croissance optimale des parasites *in vitro*. Les parasites dégradent les lipoprotéines incorporées et utilisent les lipides pour la production de leurs membranes (Coppens et al. 1987; 1988). Les formes sanguines peuvent néanmoins produire des acides gras *de novo* lorsque la concentration dans l'hôte mammifère n'est pas suffisante pour répondre à leurs besoins. C'est le cas notamment du myristate, acide gras formant l'ancre GPI des VSG (Morita, Paul, et Englund 2000; Paul et al. 2001). De plus, les besoins en acides gras vont dépendre de la niche parasitaire : les ressources diffèrent entre le tissu adipeux riche en acides gras et le fluide cérébrospinal pauvre en lipides (Poudyal et Paul 2022).

Comme expliqué précédemment, chez la forme procyclique, une partie de l'acétate produite est convertie en acétyl-CoA dans le cytosol par l'acétyl-CoA synthétase. L'acétyl-CoA est utilisé pour produire du malonyl-CoA, qui entre ensuite dans les deux voies de synthèse des acides gras chez *T. brucei* : une voie mitochondriale appelée système de synthèse des acides gras II (FASII, *type II fatty acid synthase system*) qui produit majoritairement de l'acide octanoïque (C8:0) et de l'acide palmitique (C16:0) et représente 10% de la production d'acides gras dans la cellule (Stephens et al. 2007), ou le système du RE appelé ELO, qui utilise des élongases localisées dans ce compartiment.

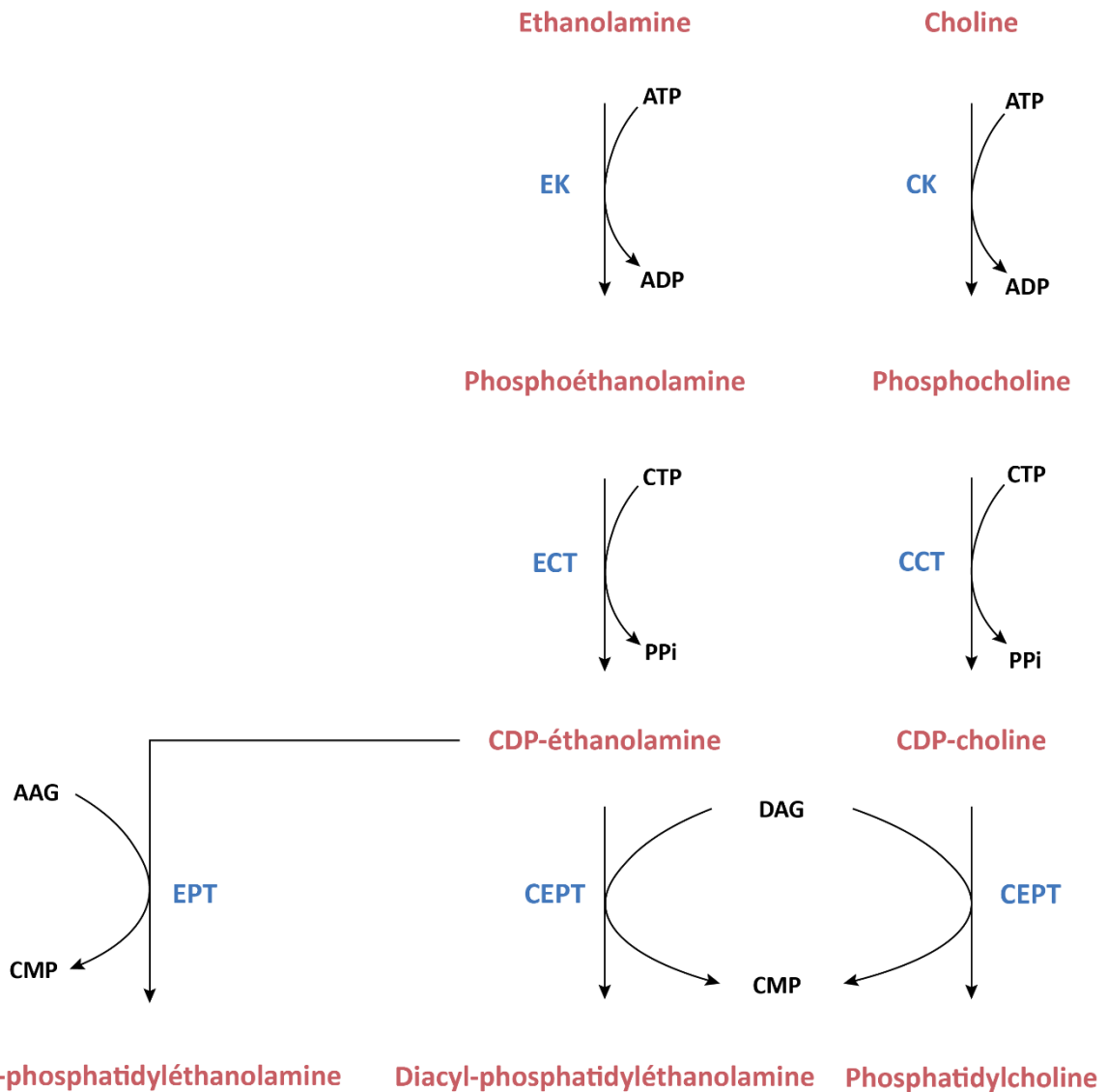


Figure 17 : La voie de Kennedy chez *Trypanosoma brucei*.

E/CK, éthanolamine/choline kinase ; E/CCT, éthanolamine/choline cytidylyltransférase ; EPT, éthanolamine phosphotransférase ; CEPT, choline/éthanolamine phosphotransférase. AAG, alkyl-glycérol ; DAG, diacylglycérol ; CMP, cytidine monophosphate, PPi, pyrophosphate inorganique. Réalisé sur Illustrator.

Les deux voies sont essentielles au parasite (Lee et al. 2006; Guler et al. 2008). Chez d'autres organismes, les acides gras sont oxydés dans la mitochondrie par la voie de la β -oxydation, qui permet d'alimenter le cycle de Krebs et produire de l'énergie pour la cellule ; l'importance de cette voie chez *T. brucei* en tant que source d'énergie reste discutée, car elle n'a jamais été observée *in vitro* (Poudyal et Paul 2022).

Les acides gras sont les composants essentiels des phospholipides (PL), qui constituent notamment les membranes biologiques. Les PL et leur composition influencent non seulement la fluidité, la courbe et la tension de surface membranaires, mais aussi les propriétés des protéines membranaires (Farine et al. 2017). Les PL les plus représentés chez les eucaryotes, dont *T. brucei*, sont la phosphatidylcholine (PC, 45 à 60%) et la phosphatidyléthanolamine (PE, 10 à 20%), suivi du phosphatidylinositol (PI, 6 à 12 %) et de la phosphatidylsérine (PS, moins de 4%) (Smith et Bütikofer 2010). La synthèse *de novo* des phospholipides chez *T. brucei* est essentielle à la survie des parasites, chez les formes sanguines et procycliques. La PC et la PE sont très majoritairement synthétisés par la voie de Kennedy à partir de la choline et de l'éthanolamine (Figure 17) (Farine et al. 2015). Derrière les PL, les sphingolipides (SL) et stérols sont d'importants composants des membranes (Parreira de Aquino et al. 2021). Les lipides servent également de molécules de signalisation, comme l'acide arachidonique (C20:4), qui stimule chez *T. brucei* la libération de Ca^{2+} (Eintracht et al. 1998; Catisti et al. 2000). L'acide arachidonique est un précurseur majeur de la synthèse des éicosanoïdes, molécules dérivées d'acides gras polyinsaturés (PUFA) impliquées dans la réponse inflammatoire chez les mammifères, mais son rôle chez *T. brucei* n'est pas défini. Les PL produits peuvent également être dégradés pour alimenter les parasites en acides gras et lysophospholipides (LysoPL), servant souvent de molécules bioactives impliquées dans les voies de signalisation et le métabolisme énergétique. Cela implique l'action d'enzymes spécifiques appelées phospholipases.

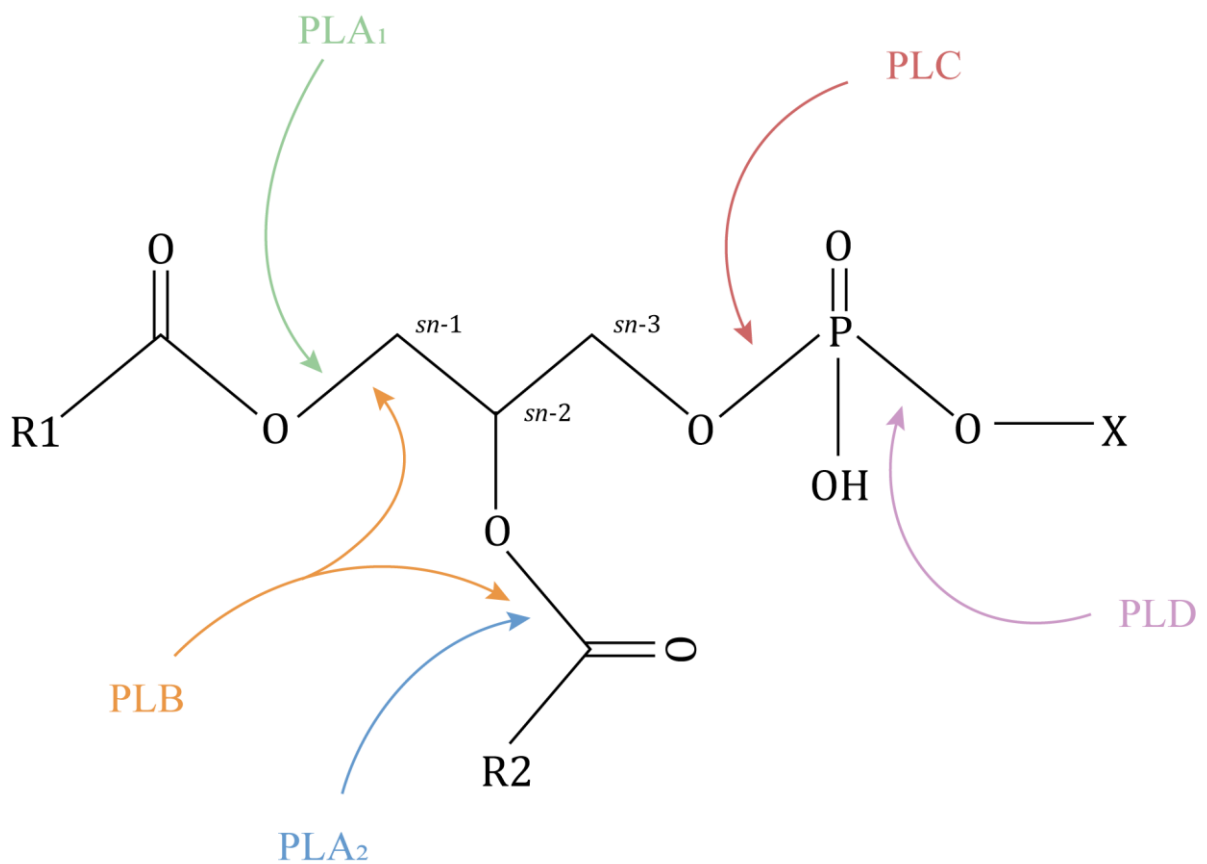


Figure 18 : Structure d'un phospholipide et sites d'hydrolyse des phospholipases A1, A2, B, C et D.

Un phospholipide, ou glycérophospholipide, est typiquement composé d'un glycérol-3-phosphate estérifié par des acides gras non polaires aux positions *sn-1* (R1) et *sn-2* (R2) et une tête polaire contenant un alcool (X = sérine, éthanolamine, choline, etc...) sur le groupe phosphate. Les phospholipases agissent plus ou moins spécifiquement sur les sites désignés par les flèches. Les atomes de carbone du glycérol sont désignés par leur numéro stéréochimique (*sn-1*, *sn-2* et *sn-3*). Réalisé sur Illustrator.

1.2. Les phospholipases A

Les phospholipases (EC 3.1.-.-, Commission des Enzymes) sont des enzymes lipolytiques ayant la capacité d'hydrolyser les PL au niveau de liens ester spécifiques. Elles font partie de la superfamille des α/β hydrolases, enzymes dont le cœur est un feuillet α/β . Elles sont classées selon ce site d'action en phospholipases A₁, A₂, B, C ou D (Figure 18). Les fonctions de ces enzymes sont diverses et incluent la production de lipides bioactifs impliqués dans la signalisation cellulaire, la modulation de la réponse immunitaire, le métabolisme lipidique et le renouvellement des membranes (Aloulou et al. 2018). Ce sont également des toxines majeures chez les animaux venimeux comme les cnidaires, les araignées et les serpents, où elles possèdent des activités hémolytiques, cytolytiques ou encore neurotoxiques (Zambelli et al. 2017). Enfin, les phospholipases, et majoritairement les phospholipases A (PLA) sont impliquées dans la virulence et/ou la pathogénicité de nombreux organismes pathogènes. On retrouve ce rôle chez les bactéries (*Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia pestis*) (Schmiel et al. 1998), les champignons (*Candida* sp.), mais également les parasites (*Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Leishmania*, *T. cruzi*) (Hervé et al. 2023). En raison de leur rôle dans le maintien des membranes et l'homéostasie lipidique, ces enzymes sont présentes universellement dans les organismes vivants et possèdent des fonctions diverses. Bien qu'elles soient nommées phospholipases, certaines enzymes possèdent des substrats autres que les PL : LysoPL, triacylglycérols (TAG)... Selon les enzymes et leur spectre de substrat, les phospholipases sont ainsi plus ou moins difficiles à classer. On sépare tout de même les acyl hydrolases (phospholipases A₁, A₂, et B) des phosphodiesterases (phospholipases C et D).

L'activité phospholipase, et plus généralement de la classe des lipases (EC 3.1.1.3), dépend de trois résidus formant une triade catalytique : i) une sérine (Ser, S) retrouvée dans un motif GxSxG (G ; glycine, x ; n'importe quel acide aminé), ii) une histidine (His, H) et iii) un acide aspartique (Asp, D) suivi d'une glycine (DG). Cependant, la sérine catalytique seule, ou la dyade Ser-Asp est souvent suffisante et nécessaire pour l'activité de nombreuses lipases (Aloulou et al. 2018; Casas-Godoy et al. 2018). En plus de la triade catalytique Ser-His-Asp, les lipases possèdent un trou oxyanion, cavité riche en glycines dans la structure de l'enzyme.

Durant la réaction enzymatique, l'intermédiaire formé est stabilisé par la présence de liaisons hydrogènes apportés par ce trou. Pour permettre cette stabilisation, le trou oxyanion est positionné à proximité de la sérine catalytique dans la structure tertiaire des lipases (Casas-Godoy et al. 2018).

1.2.1. Phospholipases A₁

Les PLA₁ (EC 3.1.1.32) hydrolysent spécifiquement les PL au niveau du lien ester en position *sn*-1 (Figure 18), libérant un LysoPL et un acide gras. Des PLA₁ ont été détectées chez de nombreux organismes, des bactéries aux mammifères, mais cette famille de phospholipases et leurs fonctions physiologiques restent relativement peu connues. Cela est notamment dû à leurs spectres de substrat plus ou moins larges et leurs activités sur d'autres types de lipides (TAG, LysoPL). L'activité PLA₁ a tout de même été décrite chez des pathogènes comme facteur de virulence, dans le venin des serpents et chez les mammifères *in vitro* (Richmond et Smith 2011; Aoki et al. 2007).

1.2.2. Phospholipases A₂

Les phospholipases A₂ (PLA₂) (3.1.1.4) hydrolysent les PL au niveau du lien ester *sn*-2 pour produire des lysoPL et des acides gras libres (Figure 18). Les produits de ces réactions possèdent d'importants rôles physiologiques : on retrouve notamment l'acide arachidonique, précurseur des éicosanoïdes. Ce groupe de molécules inclut les prostaglandines et les leucotriènes, hormones agissant comme d'importants médiateurs de la réponse inflammatoire et allergique chez les eucaryotes supérieurs (Bogatcheva et al. 2005). Les PLA₂ sont les phospholipases les plus étudiées et les mieux connues. Elles forment une superfamille répartie en plusieurs classes, dont les plus connues sont les PLA₂ cytosoliques (cPLA₂), sécrétées (sPLA₂), calcium-indépendantes (iPLA₂) et les acétylhydrolases du facteur d'activation plaquettaire (PAFAH) (Aloulou et al. 2018).

1.2.2.1. Cytosoliques

Les cPLA₂ sont caractérisées par une dyade catalytique composée d'une sérine active présente dans un motif consensus légèrement modifié (GxSxS/A au lieu de GxSxG) et un acide aspartique (dyade Ser-Asp). Elles dépendent de la présence de Ca²⁺ intracellulaire pour leur activité. Les PLA₂ de cette classe possèdent également une activité lysophospholipase (LysoPLA).

Ces protéines sont surtout étudiées chez les mammifères ; la protéine cPLA₂ α , aussi appelée GIVA-PLA₂ semble notamment impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires (Dennis et al. 2011; Aloulou et al. 2018).

1.2.2.2. Sécrétées

Les sPLA₂ forment une famille de protéines à poids moléculaire faible (entre 14 et 18 kDa) contenant généralement entre 6 et 8 ponts disulfures. Ces enzymes retrouvées dans de nombreux organismes : plantes, insectes, mammifères, virus et champignons (Aloulou et al. 2018). Chez cette classe de PLA₂, l'activité est due à une dyade His-Asp et la présence de Ca²⁺ est nécessaire ; les enzymes possèdent une boucle de liaisons aux ions Ca²⁺ de motif xCGxGG et possèdent une structure tertiaire similaire (Dennis 1994). La plupart des sPLA₂ ont une préférence pour les phospholipides anioniques comme substrats, tels que la phosphatidylglycérol (PG), PE et PS, mais les substrats restent peu spécifiques. Contrairement aux cPLA₂, les sPLA₂ ont uniquement une activité PLA₂ (Dennis et al. 2011).

Les sPLA₂ font également partie des composants principaux des venins d'animaux (Nevalainen et al. 2004; Gutiérrez et Lomonte 2013; Krayem et Gargouri 2020).

1.2.2.3. Acétylhydrolase du facteur d'activation plaquettaire

Les PLA₂ hydrolases du facteur d'activation plaquettaire (PAFAH, *platelet-activating factor acetylhydrolase*) (EC 3.1.1.47) sont des PLA₂ dont le substrat majeur est le facteur d'activation plaquettaire (PAF, *platelet-activating factor*). PAF est un phospholipide dit plasmalogène impliqué dans la réaction allergique et de nombreuses maladies inflammatoires humaines : maladies cardiovasculaires, neurologiques, choc septique... Ce médiateur est notamment utilisé comme biomarqueur et cible thérapeutique. Tout comme les iPLA₂, l'activité des PAFAH est indépendante de la présence de Ca²⁺ (Upton et al. 2022). Les PAFAH peuvent être identifiées par un motif spécifique, FSHGL, qui s'ajoute au motif associé à la sérine catalytique GxSxG. Chez les mammifères, il existe trois isoformes de PAFAH : PAFAH plasmatique, PAFAH I et PAFAH II (Kono et Arai 2019).

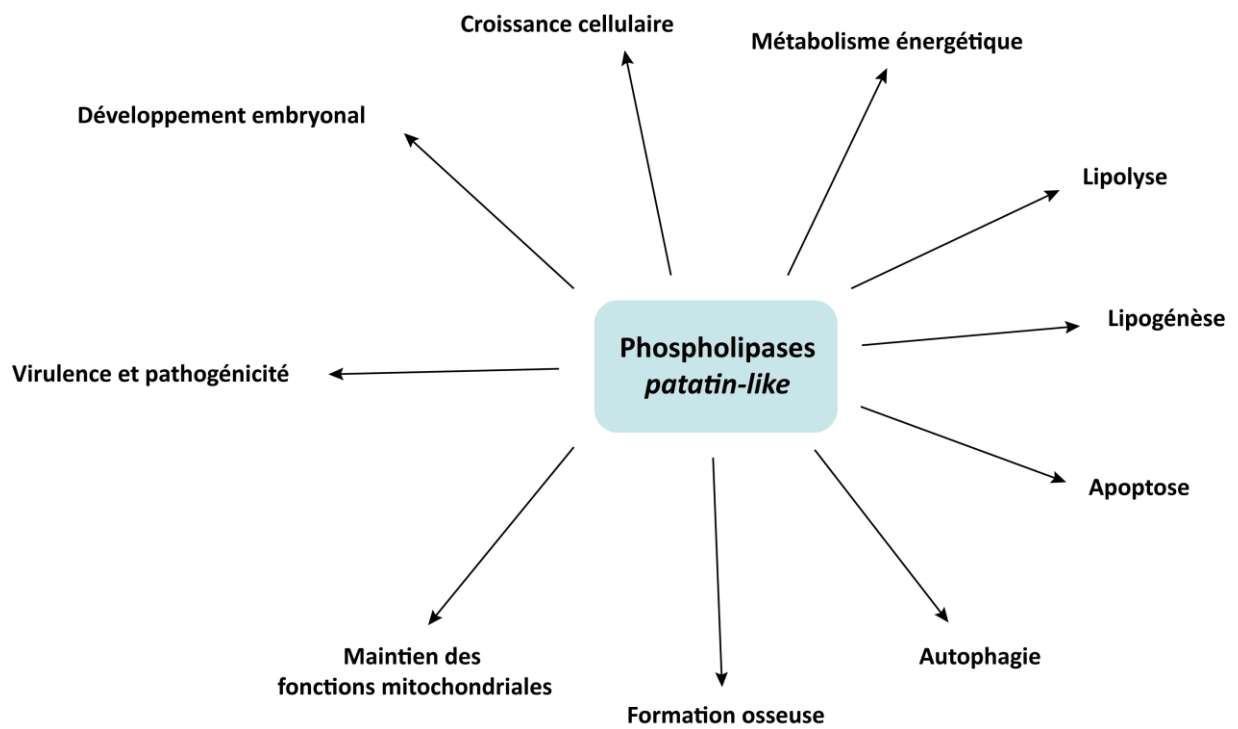


Figure 19 : Fonctions associées aux phospholipases *patatin-like* chez les organismes.
Réalisé sur Illustrator.

1.2.2.4. Calcium-indépendantes

Les iPLA₂ ne requièrent pas de Ca²⁺ pour leur activité ou leur translocation. De nombreuses protéines de cette classe possèdent, en plus de l'activité PLA₂, des activités secondaires LysoPLA, PLA₁ ou transacylases (Aloulou et al. 2018).

La classe des iPLA₂ comprend un groupe important d'enzymes appelées phospholipases *patatin-like* (PLP, *patatin-like phospholipase*) ou encore *patatin-like phospholipase domain-containing protein* (PNPLA) chez les mammifères. Ces protéines tiennent leur nom de la patatine, une glycoprotéine possédant une activité PLA₂ retrouvée dans les tubercules de pommes de terre (Racusen et Foote 1980; Dhondt et al. 2000). *Homo sapiens* possède neuf PNPLA, allant de PNPLA1 à PNPLA9, chacune ayant des rôles et substrats différents. Elles sont plus ou moins essentielles dans l'homéostasie lipidique et sont impliquées dans plusieurs maladies métaboliques, et la majorité d'entre elles sont associées à un compartiment spécifique appelée gouttelettes lipidiques (Lulić et Katalinić 2023). De plus, de nombreux rôles leurs sont associés chez les mammifères : formation osseuse, hydrolyse de la cardiolipine (lipide essentiel dans les fonctions mitochondriales), autophagie, etc... (Figure 19). Les PLP sont également retrouvés chez les pathogènes : bactéries, champignons et parasites.

L'une des PLP les mieux caractérisées est ExoU de *P. aeruginosa*. Cette protéine est une toxine sécrétée à partir du système de sécrétion de type III des bactéries. Elle est activée par ubiquitination par les cellules hôtes et amène à la dégradation des membranes cellulaires (Sawa et al. 2016). D'autres bactéries pathogènes comme *Rickettsia typhi* (Rahman et al. 2010) ou *Legionella pneumophila* (Ku et al. 2012) possèdent également des PLP importantes pour leur virulence et leur pathogénicité. Chez plusieurs parasites protozoaires, les PLP sont impliquées dans la survie et les interactions avec l'hôte (Hervé et al. 2023)

1.2.3. Lysophospholipases

Les LysoPLA (EC 3.1.1.5) ont une activité sur les LysoPL issus de l'hydrolyse des PL par les PLA₁ ou PLA₂. Tout comme les PLA₁, PLA₂ et phospholipases B (PLB), ce sont des acyl hydrolases. Les LysoPLA peuvent, à l'instar des PLA, être séparées selon leur site d'action sur les LysoPL en position *sn*-1 (LysoPLA₁) ou *sn*-2 (LysoPLA₂), mais ces enzymes peuvent avoir une activité sur les deux sites (Wang et al. 1997; Wang et Dennis 1999). Tout comme les PLA₁, les LysoPLA forment un groupe d'enzymes relativement mal caractérisé.

Elles restent cependant des enzymes importantes dans la régulation de la quantité de LysoPL, dont les concentrations dans les membranes biologiques doivent être très faibles pour éviter des modifications dans la conformation des membranes ou perturber l'activité d'enzymes membranaires. Les LysoPL agissent en effet comme des détergents potentiellement toxiques. La présence élevée de LysoPL est notamment associée à plusieurs maladies inflammatoires et métaboliques. En concentrations normales, les LysoPL comme la lysophosphatidylcholine agissent comme messagers secondaires et peuvent, entre autres, moduler les réponses immunitaires chez les mammifères (Wang et Dennis 1999; Richmond et Smith 2011).

1.2.4. « Phospholipases A and Lysophospholipases in protozoan parasites »

1.2.4.1. Présentation de la revue

Les PLA et LysoPLA représentent une classe complexe et très diverses d'enzymes responsables de l'hydrolyse des phospholipides et lysophospholipides. Chez les organismes pathogènes comme les bactéries (*Rickettsia*, *Pseudomonas*) et champignons (*Candida*), les PLA et LysoPLA sont associés à leur virulence et pathogénicité. Chez les parasites protozoaires, quelques enzymes ont été découvertes et montrent leur importance dans la survie des parasites chez l'hôte et le maintien de l'infection. Dans cette revue, nous faisons état de la littérature concernant les PLA et LysoPLA chez 10 parasites protozoaires représentant un intérêt en recherche et en médecine : *T. brucei*, *T. cruzi*, *Leishmania* sp., *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* sp., *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica* et *Naegleria fowleri*. Nous discutons également du potentiel de ces enzymes comme cibles diagnostiques ou médicamenteuses.

1.2.4.2. Revue

Phospholipases A and Lysophospholipases in protozoan parasites

Perrine Hervé^{1,*}, Sarah Monic¹, Frédéric Bringaud¹ and Loïc Rivière^{1,*}

¹ Université de Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, CNRS UMR 5234, Bordeaux, France.

* Corresponding Authors:

Perrine Hervé, Université de Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, CNRS UMR 5234, Bordeaux, France; Email: perrine.herve@u-bordeaux.fr

Loïc Rivière, Université de Bordeaux, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, CNRS UMR 5234, Bordeaux, France; Email: loic.riviere@u-bordeaux.fr

ABSTRACT Phospholipases (PLs) and Lysophospholipases (LysoPLs) are a diverse group of esterases responsible for phospholipid or lysophospholipid hydrolysis. They are involved in several biological processes, including lipid catabolism, modulation of the immune response and membrane maintenance. PLs are classified depending on their site of hydrolysis as PLA1, PLA2, PLC and PLD. In many pathogenic microorganisms, from bacteria to fungi, PLAs and LysoPLs have been described as critical virulence and/or pathogenicity factors. In protozoan parasites, a group containing major human and animal pathogens, growing literature show that PLAs and LysoPLs are also involved in the host infection. Their ubiquitous presence and role in host-pathogen interactions make them particularly interesting to study. In this review, we summarize the literature on PLAs and LysoPLs in several protozoan parasites of medical relevance, and discuss the growing interest for them as potential drug and vaccine targets.

doi: 10.15698/mic2023.10.805

Received originally: 15.05.2023;

in revised form: 25.08.2023,

Accepted 05.09.2023,

Published 02.10.2023

Keywords: phospholipases, lysophospholipases, protozoan, host-pathogen interactions, virulence factors, metabolism.

Abbreviations:

PLs – phospholipases, **LysoPLs** – lysophospholipases, **TgLCAT** – lecithin:cholesterol acyltransferase, **PC** – phosphatidylcholine, **PV** – parasitophorous vacuole, **PLPs** – patatin-like phospholipases, **4-BPB** – 4-p-bromophenacyl bromide, **AA** – arachidonic acid, **RBCs** – red blood cells, **PRDX6** – peroxiredoxin 6, **MAFP** – methyl arachidonyl fluorophosphonate, **LysoPC** – lysophosphatidylcholine, **sPLA2** – secreted PLA2, **HAT/AAT** – human and animal african trypanosomiasis, **VSG** – variant surface glycoprotein, **GPI** – glycosylphosphatidylinositol, **PGE2** – prostaglandin E2, **OBAA** – 3-(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid, **PAF** – platelet-activating factor, **Orlistat** – tetrahydrolipstatin, **ER** – endoplasmic reticulum.

INTRODUCTION

Phospholipases (PLs) and lysophospholipases (LysoPLs) are a widespread and complex group of lipolytic enzymes responsible for the hydrolysis of phospholipids and lysophospholipids, respectively. They are classified as A1, A2, C and D according to their site of cleavage (Fig. 1) [1]. These enzymes are involved in several biological processes including modulation of the immune response, cell signaling, membrane remodeling and lipid metabolism [2, 3]. Some of them, mainly phospholipases A (PLAs) and LysoPLs, play important roles in the virulence and pathogenicity of several groups of pathogens such as bacteria (*Pseudomonas*, *Rickettsia*) and fungi (*Candida*) [4, 5]. PLAs are also major toxins of venomous species [6]. For detailed information regarding PLs, please refer to Aloulou *et al.* [1].

Protozoans form a group of eukaryotic unicellular organisms that contain parasites responsible for severe and

even fatal diseases worldwide. Their modes of transmission are diverse and include vectors (insects, gasteropods, annelids, etc.), contaminated food, water or soil, congenital transmission, blood transfusion or organ transplantation. Some of the diseases they cause are especially prevalent in developing countries due to lower standards of living and an advantageous climate for the presence of vectors. However, migration and climate change could favor the spread of these parasites globally. While some parasites such as the Apicomplexan *Plasmodium* spp. and *Toxoplasma* are heavily studied, others remain neglected despite the high risks they represent for susceptible populations [7, 8].

The importance of PLAs and LysoPLs for virulence in pathogenic species and their ability to manipulate the host immune response make them particularly interesting in the context of host – parasite interaction. Thanks to the se-

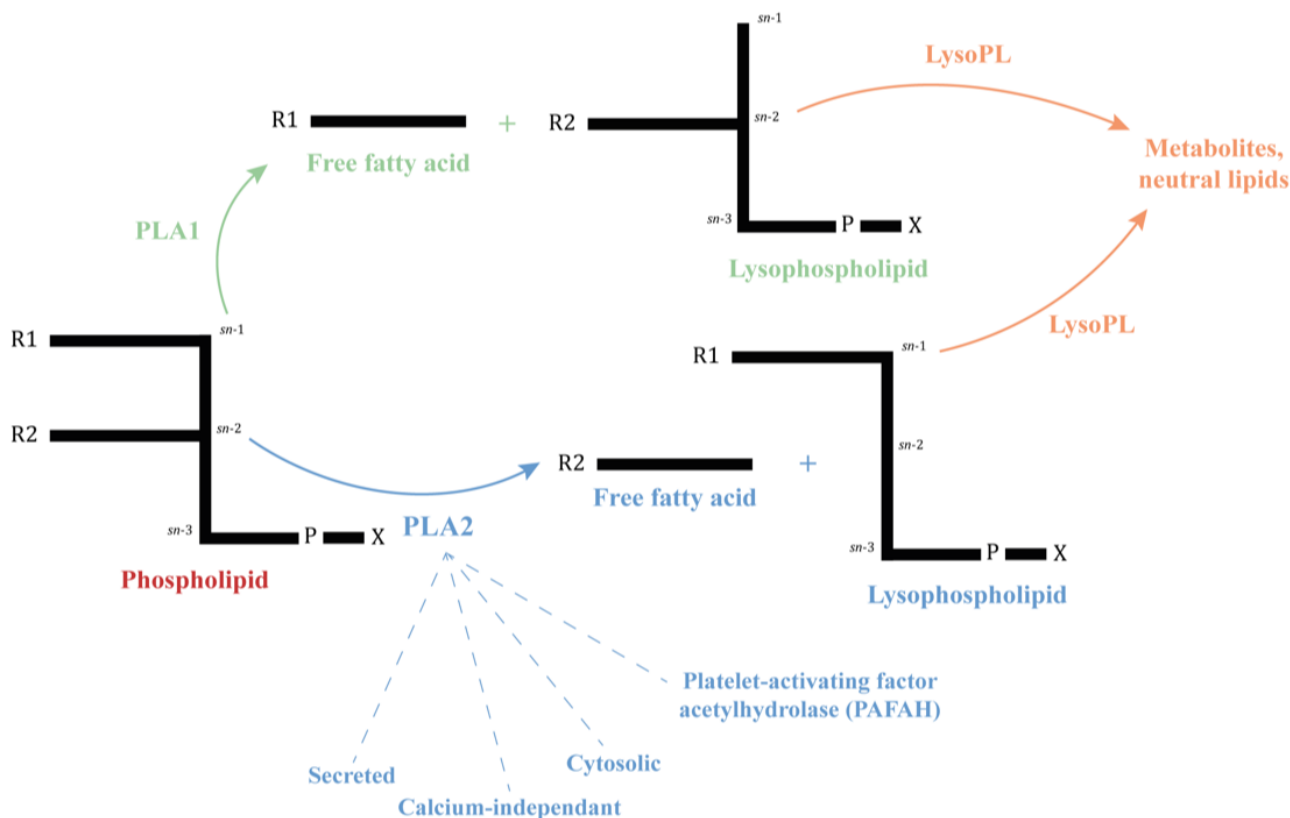


FIGURE 1: Simplified phospholipid structure and the site of cleavage of Phospholipases A and Lysophospholipases. A phospholipid consists of a glycerol-3-phosphate esterified with nonpolar fatty acids at its *sn*-1 (R1) and *sn*-2 (R2) positions and a polar headgroup (X = choline, ethanolamine, serine...) at its phosphoryl group. Phospholipases A are named A1 or A2 depending on their site on cleavage and the resulting molecules, indicated by arrows. Lysophospholipases act on lysophospholipids previously hydrolyzed by a PLA [1].

quencing of their genomes and the availability of many genomic resources, we know that most protozoan parasites likely possess several *PLA* genes (<https://veupathdb.org>). However, recent studies are particularly focused on apicomplexan parasites, neglecting other major protozoan pathogens. Some characterized PLAs in pathogenic protozoan seem to be involved in the survival of the parasite inside its host and the establishment of an infection.

In this review, we focus on the different PLAs and LysoPLs characterized in several protozoan parasites of medical interest. We also discuss the relevance of these PLAs as potential drug and vaccine targets. The different parasites and enzymes described in this review are summarized in **Table 1** at the end of the conclusion.

APICOMPLEXAN

Infections by Apicomplexan parasites represent huge health burdens worldwide. These parasites are characterized by the presence of the apicoplast, a plastid-like organelle which holds the lipid biosynthesis pathways [7].

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii is estimated to chronically infect one third of the world’s population. This parasite can infect a wide range of warm-blooded animals, but its definitive

hosts are felines. Although most infections are asymptomatic, congenital transmission or reactivation of latent disease in immunocompromised individuals such as AIDS, cancer or organ transplant patients can cause severe toxoplasmosis and represent significant public health burdens. Transmission usually occurs by ingestion of parasites or from an infected mother to the fetus. *Toxoplasma* parasites are present in three forms: an environment-resistant oocyst, a fast-replicating tachyzoite and a latent tissue cyst containing bradyzoites. *Toxoplasma* tachyzoites can replicate in a variety of nucleated cell types, while the chronic-stage bradyzoites persist as cysts within neurons or muscles [9].

Several PLAs of *Toxoplasma* have been characterized, including some important for the survival of the parasite in its host. TgLCAT (lecithin:cholesterol acyltransferase) produces cholesteryl esters through the transfer of phospholipid acyl groups (**Table 1**). The enzyme possesses both PLA2 and cholesteryl esterase activities and uses phosphatidylcholine (PC) as a substrate. TgLCAT is stored in dense granules and localizes to both the parasitophorous vacuole (PV) and plasma membrane following secretion from the dense granules. In a first study, parasites deficient for TgLCAT displayed a delay in replication and egress, suggesting a role in lipid membrane remodeling of both the para-

site during replication and host cell during parasite escape. Mice infected with TgLCAT-null mutants showed reduced virulence, while parasites overexpressing TgLCAT were more virulent than the parental strain and resulted in earlier deaths [10]. In a later study using new strains, the authors confirmed its role in egress but showed that it has no contribution to replication *in vitro* or virulence *in vivo* [11].

Other PLA2s described include patatin-like phospholipases (PLPs), Ca²⁺-independent PLA2s. Three PLPs are known in *Toxoplasma* parasites. TgPL1 reduces the level of nitric oxide in activated macrophages to prevent its own degradation (Table 1) [12]. The enzyme lacks the catalytic serine and PLA2 activity, but the presence of other catalytic residues suggests a role in binding phospholipids or as a coenzyme for other PLA2 enzymes [13]. Mice infected with TgPL1-null mutants showed a greater resistance to toxoplasmic encephalitis and a change in cytokine levels during the chronic infection. The authors also observed a defect in bradyzoite-to-tachyzoite reactivation. The protein moves from within the parasite to the cyst wall and PV during tachyzoite-to-bradyzoite differentiation. Overall, TgPL1 seems to play a role in the maintenance of the infection in the host and toxoplasmosis encephalitis by altering cytokine production in the chronic phase [14].

A second PLP, TgPL2, is located at the apicoplast. This enzyme appeared essential for apicoplast maintenance and lipid homeostasis (Table 1). In parasites deficient for TgPL2 or with a mutated catalytic serine, the apicoplast was lost or became abnormal, leading to an impaired growth *in vitro* [15].

Ca²⁺-independent PLA2 activity associated with Ca²⁺-independent PLA1 activity was described in 2000, but it is unknown if one or several proteins were responsible for these activities [16].

Finally, PLA2 activity possibly linked to host cell invasion was first reported in 1989, when it was shown that incubation of the parasite with exogenous PLA2 from cobra (*Naja mossambica*) resulted in an increase of penetration in human fibroblasts. Meanwhile, PLA2 inhibition by 4-p-bromophenacyl bromide (4-BPB) decreased cell invasion, although the authors cautioned that 4-BPB seems to have a general toxic effect on parasites. Use of another PLA2 inhibitor, dihydroguaiaretic acid, also resulted in a decreased host cell invasion [17]. PLA2 activity could trigger arachidonic acid (AA) production from host cell phospholipids, which would alter the host cell membrane and facilitate parasite entry [18]. Incubation of extracellular *Toxoplasma* with exogenous PLA2 increased the presence of the rhoptry protein ROP1 in supernatant fractions, raising the possibility of a role of PLA2 in rhoptry protein secretion [19, 20]. Based on these results, another team confirmed the role of 4-BPB on THP1 monocyte cells. Furthermore, IFN- γ treatment caused a reduction in host cell invasion, but whether that effect was direct or not on PLA is unclear [21, 22]. A PLP contributing to host cell invasion was recently reported. TgPL3 is located at the apical cap of the parasite. Δ TgPL3 parasites showed defects in invasion and rhoptry secretion; the authors hypothesize that TgPL3 has a role in either the mechanical release of rhoptry or in the signaling

pathway leading to rhoptry release (Table 1). Mutation of the catalytic serine (S1409A parasites) also suppressed enzyme activity. Mice vaccination with Δ TgPL3 or S1409A parasites protected them against a subsequent infection with a lethal dose of *Toxoplasma* parasites [23].

***Plasmodium* sp.**

Malaria is the most common and deadliest human parasitic disease, and one of the most prevalent human infectious diseases. In 2021, 247 million cases and 619,000 deaths were reported [24]. 90% of deaths occur in Africa and mainly affect children under 5 and pregnant women. Parasites are transmitted by female mosquitoes of the *Anopheles* genus. Most cases and deaths are attributed to *P. falciparum*, but 4 other species of *Plasmodium* are also responsible for human infections: *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* and *P. knowlesi*. Parasites continuously evolve inside their hosts: the sporozoite insect form, once injected into a human, turns into a merozoites in hepatocytes. Merozoites are released into the bloodstream where they invade red blood cells (RBCs) and produce gametocytes. Mosquitoes ingest these gametocytes during a blood meal [25].

Cells infected by *Plasmodium* provide lipid precursors to the parasites, which are necessary for *de novo* synthesis of phospholipids and neutral lipids. These lipids are used for membrane maintenance and remodelling [26]. The presence of (lyso)phospholipases is therefore essential for maintenance of *Plasmodium* inside their hosts. More than 20 potential genes were identified in the genome of *Plasmodium* parasites [26, 27]. It was first shown that use of gentamicin and amikacin, aminoglycosides which bind to the 30S subunit of ribosomes, but are also known as PLA1 and PLA2 inhibitors, repressed *P. falciparum* growth in pretreated erythrocytes [28]. These enzymes could also be involved in the alteration of merozoite membrane phospholipid organization in the RBCs [29]. Furthermore, upon *P. falciparum* infection, both PLA2 and LysoPL activities were detected in human erythrocytes. LysoPL activity greatly increased in infected RBCs compared to non-infected ones and was much higher than PLA2 activity, suggesting that hydrolysis by LysoPLs is an important metabolic pathway for control of lysophospholipid levels. The authors never detected PLA2 activity from erythrocytes in uninfected conditions, but the origin of this activity (parasitic or infected RBCs) is unclear. PLA2 activity was inhibited *in vitro* by the antimalarial drugs chloroquine, quinine and artemether and LysoPL activity was inhibited by quina-craine and quinine, but the IC50 values for these inhibitions appear high and could be non-specific inhibitions due to high concentrations of the drugs. LysoPL activity was also inhibited by the sulfhydryl reagents p-hydroxymercuribenzoate and thimerosal, with IC50 values in much lower ranges [30, 31]. Later on, it was shown that *P. falciparum* parasites internalize host RBC peroxiredoxin 6 (PRDX6), an enzyme with PLA2 activity. The authors found that this host enzyme is used by the parasite for repair of lipid-peroxidation damages in *P. falciparum* blood stages and is essential for hemoglobin transport to the parasite food vacuole. Use of PLA2 inhibitors binding to

PRDX6, such as methyl arachidonyl fluorophosphonate (MAFP), ATK and Darapladib, blocked parasite growth at the trophozoite stage. Use of Darapladib on WT mice arrested model rodent pathogen *P. yoelii* development, but had no effect in transgenic *prd6x*^{-/-} mice, demonstrating a possible use of PRDX6 as a host drug target for Plasmodium infection control [32]. The PLA2 activity detected in infected RBCs could therefore be coming from the host and not Plasmodium [30, 32]. LysoPC from the host is also important for *P. falciparum* differentiation during infection. Restriction of the lipid, which occurs during malaria infection, led *in vitro* to metabolic adaptation of parasites, initiating sexual commitment and formation of gametocytes [33].

Several PLAs and LysoPLs have been identified in *Plasmodium* species. *PfLPL1* is a LysoPL localized in the endoplasmic reticulum (ER) at the early stages. After erythrocyte invasion, the enzyme moves to vesicular structures that are later incorporated into lipid bodies (Table 1). These bodies are found next to the food vacuole, where is stored hemozoin, the neutralized form of the toxic by-product heme. *PfLPL1* generates lipids necessary for hemozoin formation; downregulation of the enzyme resulted in disrupted lipid homeostasis and reduced levels of neutral lipids essential for conversion of toxic heme to hemozoin [34]. Another LysoPL from *P. falciparum*, *PfLPL20*, hydrolyzes lysophosphatidylcholine (LysoPC) from the host to generate metabolites that can be used by the parasite for its growth. Like *PfLPL1*, *PfLPL20* localizes to vesicular structures that later fuse in lipid bodies [35].

Two PLs were characterized in the rodent malaria model pathogen, *P. berghei*. First, PbPL is involved in sporozoite migration, localizes at their surface and possesses both PLA2 and LCAT activity (Table 1). Infection of mice with null-mutant sporozoites through mosquito bite resulted in a significant decrease in liver infectivity. A decrease in epithelial cell layers crossing was observed in PbPL knock-out parasites. Furthermore, an hemolytic assay showed that heterologously expressed PbPL was able to damage cell membranes, which the authors hypothesize could be caused by direct hydrolysis of membrane PC or through the production of LysoPC species, which possess membrane lysis activities [36]. In infected hepatocytes, PbPL is located at the PV membrane (PVM) where it plays a role in its disruption; PbPL-deficient parasites showed a defect in merozoite release from hepatocytes and oocysts [37]. This inefficient merozoite release was also reported in PbPL's ortholog in *P. falciparum*, *PfLCAT*. Lipidomics showed no significant changes in PC or LysoPC levels in *PfLCAT*-null mutants, but an accumulation of phosphatidylserine during egress was observed. *PfLCAT*-mutants also showed an inefficient egress in asexual blood stages (Table 1) [38]. A second enzyme from *P. berghei*, PbPLA1, is a phosphatidic acid preferring PLA1 (Table 1). The cytoplasmic enzyme is not expressed in sporozoites and is not essential in both mice infection and during mosquito stages. *Pla1*⁻ parasites, like PbPL-deficient parasites, showed a defect in merozoite release from hepatocytes [39].

Just as *Toxoplasma*, *Plasmodium* species possess PLPs. *PfPATPL1* is expressed in the cytosol of asexual blood stage and gametocyte stages of *P. falciparum*. Depletion of the enzyme resulted in reduced efficiency of rounding up, egress of gametes after gametocyte activation as well as exflagellation of male gametes. Null-mutants for *PfPATPL1* showed an impaired translocation of the perforin-like protein *PfPLP2* to the membrane periphery. This translocation is necessary for destabilization of vacuolar and RBC membranes, allowing egress of gametes [40]. In a later study, another group described an effect of the PLP, which they re-named PNPLA1, in gametocyte induction rather than a deficiency in gametocytogenesis (Table 1) [41].

Cryptosporidium

Cryptosporidiosis is a major diarrheal disease in young children and immunocompromised individuals worldwide. Food and water contaminated by feces or contact with infected animals and people are responsible for the transmission of parasites. *Cryptosporidium parvum* and *hominis* are the most prevalent species found during human infections. *Cryptosporidium* can complete its life cycle in a single host, and both asexual and sexual stages are found in the intestine of infected humans. The parasite does not possess an apicoplast or mitochondrial DNA and relies on its host metabolism to survive. After ingestion of oocysts, released sporozoites invade the small intestine and develop inside epithelial cells in an extracytoplasmic niche, where they maintain the infection [42].

Currently, not a single PLA/LysoPL gene is characterized in *Cryptosporidium*. However, secreted PLA2 (sPLA2) activity was observed in parasite lysate and could be involved in the invasion of the host enterocytes. Inhibition of PLA activity by 4-BPB or anti-sPLA2 antibodies resulted in a significant reduction in parasite reproduction in human enterocyte cell lines. Furthermore, treatment of enterocytes or *C. parvum* sporozoite with sPLA2 derived from cobra (*Naja naja*) venom before *in vitro* infection enhanced the number of intracellular parasites [43].

KINETOPLASTIDS

Trypanosomatids include major pathogenic parasites responsible for neglected tropical diseases. These parasites are part of the Kinetoplastid group, organisms which possess within their single mitochondrion a concatenated and compacted network of circular DNA named kinetoplast [8].

African Trypanosomes

Human and Animal African trypanosomiasis (HAT/AAT) are neglected tropical diseases caused by different species of *Trypanosoma*. Two subspecies of *Trypanosoma brucei*, namely *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense*, cause HAT or sleeping sickness. *T. b. brucei*, *T. vivax* and *T. congolense* are responsible for Nagana or AAT. The incidence of HAT has greatly decreased and WHO estimates an interruption of its transmission by 2030, but 70 million people remain at risk for the disease [44]. AAT cases are still very high, annually causing the death of 3 million livestock and losses of

billions of US dollars in Africa. Parasites are transmitted by tsetse flies (*Glossina*) [44, 45]. African trypanosomes have a complex life cycle inside their hosts. The bloodstream mammalian form differentiates into procyclics when a tsetse fly takes a blood meal. In the insect, procyclics differentiate into epimastigotes and finally infective metacyclics, which are transmitted to mammals during a blood meal. In humans, infection occurs in two phases: an early hemolympathic stage (fever, adenopathy...) and a late encephalitic stage in the CNS (neurologic troubles, biological clock disorders...) which eventually leads to death without adequate treatment. [44]. In animals, anemia and cachexia are the main symptoms, but abortion, decrease of milk production and weight loss are also observed [46].

Higher levels of PLAs activities were first observed in *T. brucei* and *T. congolense* compared to the nonpathogenic *T. lewisi* species present in rodents [47]. This activity was more important in bloodstream forms [48] and increased with parasite burden in tissue fluids and blood plasma of *T. brucei*-infected rabbits [49]. Bloodstream forms also generated phospholipids from exogenous lysophospholipids; this activity may help the parasite acquire fatty acids for the synthesis of the variant surface glycoprotein (VSG) membrane [50]. Indeed, a GPI-specific PLA may be involved in fatty acid remodelling leading to the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol (GPI), which anchors the trypanosome VSG to the plasma membrane [51]. Lastly, LysoPLA1 and PLA1 activities were eluted together from *T. brucei* soluble protein fractions and were indissociable, suggesting that the parasite possesses an enzyme displaying both activities [52].

Two PLA1 genes have been characterized so far, both in *T. brucei*. TbPLA1 is a cytosolic enzyme displaying both PLA1 and LysoPLA1 activities and its preferred substrate is PC, resulting in the synthesis of LysoPC metabolites (Table 1) [53]. The enzyme levels and resulting metabolites were higher in the bloodstream forms compared to procyclics. Mutants for TbPLA1 were deficient in LysoPC synthesis. Homologues of this enzyme are found in the closely related *T. congolense* and *T. vivax*, but absent from more distant African trypanosomes or other Trypanosomatids. Its closest homologue is a putative PLA1 from *Soladis glossinidius*, a proteobacterium endosymbiont of the tsetse fly, suggesting that TbPLA1 may have been acquired through horizontal gene transfer [54].

TbLysoPLA is a recently characterized LysoPL. This secreted enzyme is localized in both the cytosol and glycosomes of bloodstream forms of *T. brucei*. TbLysoPLA showed PLA1 activity on non-natural phospholipids and PLA2 activity on natural phospholipids *in vitro* (Table 1). The enzyme acts on PC to produce LysoPC metabolites. TbLysoPLA is not essential for parasite survival but is probably highly immunogenic, since antibodies directed against it were generated during mice infection with *T. brucei gambiense* [55, 56].

PLA2 activity was also detected in African trypanosomes. In *T. brucei* bloodstream and procyclic forms, it may regulate Ca²⁺ entry in the parasite and catalyze AA release, which could be used to control eicosanoid acid production

and cause changes in the host cell membrane [57, 58]. Furthermore, AA is the precursor for prostaglandin E2 (PGE2), a lipidic inflammatory mediator involved in mammalian immune responses [59]. However, this AA release from phospholipids can be PLA2-independent through a sequential sn-1 deacylation followed with hydrolysis by LysoPLA [60].

As previously mentioned, GPI-PLA activity was thought to be involved in trypanosome VSG remodeling [51]. A protein with GPI-PLA2 activity mediating the GPI precursor fatty acid remodeling was identified in procyclic *T. brucei* parasites. Deletion of the enzyme resulted in the suppression of GPI-PLA2 activity (Table 1). However, this enzyme was only characterized in procyclic parasites; VSG remodeling is an essential feature of bloodstream parasites, and whether or not it is essential in this form and its definitive role remain to be studied. The authors also caution that procyclic and bloodstream form parasites may use different genes for this same activity. Moreover, the authors hypothesize that another gene studied in this paper may encode for a GPI-PLA1 protein or a GPI-PLA2 activity in bloodstream parasites, but did not show it [61].

Anemia is a major symptom of *T. congolense* infection. A PLA2 from the parasite may be directly or indirectly responsible for the hemolytic activity observed during the course of infection, but the enzyme(s) involved is/are unidentified [62–66].

Trypanosoma cruzi

Trypanosoma cruzi is responsible for Chagas disease or American trypanosomiasis. This anthrozoosis is endemic in Latin America, although human migrations are leading to a global spread of the parasite. In endemic regions, the annual number of cases is estimated at 6 to 7 million, with many more at risk. *T. cruzi* is mainly transmitted by triatomine insects, also known as kissing bugs. The parasite has three main stages: a non-infective insect epimastigote, an infective trypomastigote and an intracellular replicating form inside mammals, the amastigote. The acute phase of infection is usually asymptomatic, with parasites invading and replicating in the peripheral circulation. Parasites can migrate to cardiac and digestive tissues where they contribute to the chronicity of the disease [67].

Phospholipases of *T. cruzi* are likely involved in global cellular lipid remodeling throughout the parasite's life cycle and temperature acclimation [68]. Both PLA1 and PLA2 membrane-associated activities on anionic phospholipids were observed in epimastigotes and may also be implicated in differentiation from trypomastigotes to amastigotes [69, 70]. Furthermore, the presence of exogenous PLA2 significantly increased association between *T. cruzi* and macrophages, but the origin of the enzyme was not specified. This association was reduced by use of PLA2 inhibitors such as 4-BPB, quinacrine and phentemine. A PLA2 could therefore be involved in macrophage invasion [71].

The previous observation in *T. brucei* that Ca²⁺ entry was regulated by generation of AA by PLA2 activity was also seen in *T. cruzi* amastigotes by addition of a PLA2 activator, melittin. In parallel, addition of the PLA2 inhibitor 3-

(4-octadecyl)-benzoylacrylic acid (OBAA) decreased this influx [58].

TcPLA1 is the only PLA characterized in *T. cruzi*. It is responsible for PC degradation in autolysing parasites. The enzyme possesses both PLA1 and LysoPLA1 activities and its PLA1 activity is 20-fold higher in the infective trypomastigotes and amastigotes compared to non-infective epimastigotes [72]. In epimastigotes, TcPLA1 is found in the lysosome while in infective stages the activity of the enzyme is membrane-bound. Secretion of TcPLA1 was observed during differentiation from epimastigotes to trypomastigotes. *In vitro*, TcPLA1 generates DG, FFA and LPC, lipid secondary messengers that activate host cell protein kinase C which leads to an upregulation of parasite invasion [73]. Accumulation of bioactive products such as LysoPC could be controlled by the LysoPLA activity of the enzyme. Distinct levels of TcPLA1 activity were found between lethal and non-lethal strains of bloodstream trypomastigotes and use of antibodies directed against TcPLA1 reduced host cell invasion *in vitro* [74]

Leishmania spp.

Leishmaniasis comprises several zoonotic disease endemic in many countries of Latin America and Asia. More than 20 species of *Leishmania* are responsible for the different clinical manifestations of leishmaniasis. The two main clinical manifestations are visceral leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis. Hundreds of millions are at risk for each disease in almost 100 endemic countries. 700,000 to 1 million cases are reported every year. Parasites are transmitted by female phlebotomine sandflies. *Leishmania* exists in two forms: the mammalian stage amastigote and the insect stage promastigote. After infection, promastigotes parasites are phagocytosed by host macrophages, where they differentiate into infective amastigotes and multiply inside a parasitophorous vacuole. Parasites can persist for decades and reactivate in immunocompromised patients [75].

A first report showed that infection of macrophages by *L. amazonensis*, causative agent of cutaneous leishmaniasis, resulted in a significant increase of LysoPC in the host cell. LysoPC and AA are products of PLA2 activity on PC; production of PGE2 from AA is known to exacerbate *Leishmania* infection in macrophages [76, 77]. However, the origin of this activity (parasite or macrophage) was not specified [76]. PLA2 activity was detected in the supernatant and lysate of *L. amazonensis*. Treatment of amastigotes with PLA2 from *Crotalus durissus collilineatus* snake increased the growth of parasites within macrophages. Infection of BALB/c mice after promastigote treatment with PLA2 led to an increase in lesion size and larger regions of necrosis, as well as a higher density of inflammatory infiltrate. PLA2 activity inhibited IL-2 levels, a cytokine associated with a protective Th1 response and PGE2 generation. PLA2 activity in *Leishmania* parasites thus may be a mediator of cutaneous leishmaniasis [78]. In parallel, addition of the PLA2 inhibitors bromoenol lactone (BEL or MAFP) affected the survival of *L. (L.) amazonensis* promastigotes in culture. Treatment of intracellular *L. (L.) amazonensis* amastigotes

with the same inhibitors resulted in decreased macrophage parasitism. Finally, BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with BEL presented a reduction of lesion size after 6 weeks of infection compared to non-treated infected mice. This decrease was associated with decreased skin parasitism [79].

Similarly, to *T. cruzi*, addition of melittin increased Ca^{2+} influx in *L. donovani* promastigotes. Inhibition by OBAA reduced this influx [58].

Leishmania parasites possess in their genome a *LmHydroPLAFAH* gene (platelet-activating factor-acetylhydrolase) encoding a Ca^{2+} -independent PLA2 which hydrolyzes platelet-activating factors (PAF), phosphoglycerides involved in inflammation (Table 1). The enzyme is found in the ER of promastigotes and amastigotes. Null-mutants for the enzyme showed no phenotype *in vitro* but a reduced virulence was observed in *L. major*-infected BALB/c mice. LmPAFAH may regulate levels of host platelet-activating factor (PAF), which could inhibit *Leishmania* survival in macrophages by NO activation. It may also be involved in mediation of levels of LysoPC to facilitate parasite survival [80]. The PAFAH protein from *L. major*, along with its ortholog in *T. cruzi* and *T. brucei*, is therefore an interesting drug and vaccine target [81].

LbPLA1 from *L. braziliensis* is responsible for PC hydrolysis in infective amastigotes and insect promastigotes. The purified recombinant protein exhibited PLA1 activity. The enzyme had a higher activity in amastigotes [82].

LdLip3 is a secreted lipase from *L. donovani*. The enzyme, found in both amastigote and promastigote forms, could act on host fatty acids in order to synthesize lipids for parasite growth and survival, as well as tissue damage associated with leishmaniasis (Table 1) [83].

OTHER PROTOZOAN PARASITES OF MEDICAL RELEVANCE

Beside the more popular Apicomplexan and Trypanosomatids, some protozoan parasites such as amoebas or other flagellates cause severe disease worldwide.

Entamoeba histolytica

Intestinal amebiasis caused by *Entamoeba histolytica* is a prevalent disease in developing countries with lower standards of sanitation. With 100 million cases each year, it is the fourth highest infectious parasite. 90% of infections remain asymptomatic. Two stages have been described: an active pathogenic trophozoite and a disseminating environmental amebic cyst. After ingestion of cysts through contaminated stools, released trophozoites invade the intestine and colonize the colon. In symptomatic cases, parasites interact with the epithelial cells and cause tissue damages [84].

It was first shown that antagonists of PLAs such as the PC analog Rosenthal's inhibitor and hydrocortisone were able to inhibit the cytolytic effects of trophozoite parasites *in vitro*, suggesting the involvement of PLAs in host cells lysis. [85]. The authors raised the hypothesis that *Entamoeba* PLA could directly act on the membrane of the

target cell, or indirectly by the generation of cytotoxic lysocompounds. A more speculated argument could be the insertion of PLA in membranes, resulting in the activation of intracellular host PL and inducing autolysis in the presence of extracellular Ca^{2+} [85]. The same team also described Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent PLAs. The first one was associated with membrane fractions while the second was mainly found in soluble fractions. A link was then established between these activities and cytolytic effects on host cells [86]. Hemolytic activity of *E. histolytica* was associated with a vesicular subcellular fraction called P30 and most likely due to a PLA [87–89]. In this fraction, both PLA1 and PLA2 as well as LysoPLA activities were identified [90]. Finally, it was observed that long-term axenic culture of *Entamoeba* caused a diminution of erythrophagocytosis, PLA2 and hemolytic activities. This was correlated with an impaired virulence of parasites [91]. The role of these PLAs in the virulence and pathogenicity of the parasite remains to be described. Although the genome of *E. histolytica* was sequenced in 2005 [92], no PLA-encoding gene has been characterized yet.

Naegleria fowleri

Primary amoebic meningoencephalitis by the brain-eating amoeba *Naegleria fowleri* is a deadly, fulminating disease with a 98% mortality rate. The parasite possesses three forms: a pathogenic trophozoite, a transitory flagellated form in the presence of water and an environment-resistant cyst. After the parasite enters its host, most commonly through the nose when swimming, replicating trophozoites migrate to the olfactory bulb, where they enter the brain. Once in the CNS, the parasites proliferate and destroy tissue, ultimately causing death in 7 to 10 days [93].

In the early eighties it was shown that PLA, LysoPL and sphingomyelinase activities were substantially increased in the virulent *N. fowleri* cell line compared to non-pathogenic *Naegleria* spp. These activities were associated with cells and cell-free culture media. Moreover, the authors showed evidence that lipolytic activities were released in the media of the virulent cell line but not in culture media of non-pathogenic attenuated cells [94]. In a later study, the authors showed that PL-enriched culture of pathogenic *Naegleria* induced the degradation of human phospholipids [95]. This secreted activity could be at least partially responsible for the lipolytic activity observed in primary amoebic meningoencephalitis [96]. A Ca^{2+} -independent PLA2 associated with membrane fraction could play a role in the parasite metabolism [97]. However, no PLA gene has been characterized yet.

Giardia

With a prevalence up to 30% in developing countries and 300 million cases reported each year, giardiasis is one of the most common diarrheal disease worldwide. *G. duodenalis*, also known as *G. intestinalis* or *G. lamblia*, can infect all mammals. Infection occurs via the fecal-oral route, most commonly by ingestion of contaminated water.

Giardia exists in two forms: a replicating trophozoite and a form of dissemination, the cyst. Once ingested cysts reach the stomach, the acidic pH and gastric enzymes induce an excystation. Parasites then migrate to the duodenum and differentiate into trophozoites. They adhere to intestinal epithelial cells where they multiply. Trophozoite can encyst back into quadrinucleated cysts, which are shed in the environment through the feces [98].

PLA activity has been detected in *in vitro* culture of *Giardia* [99, 100]. Like for *Entamoeba*, PLA2 activity was found in the P30 subcellular fraction. Cell fractionation suggested that two isoforms of PL sensitive to Rosenthal's inhibitor could be separated, one being membrane-bound and the other soluble [99]. The authors hypothesized that these activities could be responsible for the cytotoxicity of the parasite [99]. Interestingly, *Giardia intestinalis* is sensitive to the lipase inhibitor Tetrahydrolipstatin (Orlistat) *in vitro*, a drug which is also active on trypanosomes and *Plasmodium*. The target of Orlistat could be enzymes with a GX SXG motif, which is found in both PLA and fatty acid synthases [101].

Trichomonas vaginalis

Trichomoniasis is the most common non-viral sexually transmitted infection in the world, with more than 250 million cases per year. *Trichomonas* only exists as a trophozoite. After infection, the parasite colonizes the human lower urogenital tract and adhere to host genital epithelial cells. Men are more commonly asymptomatic than women, but both are carriers and can manifest symptoms. [102]. Several studies suggest the role of a PLA2 in the pathogenicity of this parasite. PLA2 activity was measured in the vaginal fluids of pregnant women, which correlated with *Trichomonas* infection [103]. A material found in the soluble lytic fraction of *Trichomonas* had hemolytic activity and was able to degrade PC with lysed profiles similar to those obtained with a PLA2, suggesting that this lipase activity is PLA2-like [104]. PLA activity was detected in a subcellular fraction of *Trichomonas*. An hemolytic activity was correlated with the fraction, which decreased with addition of Rosenthal's inhibitor [105]. This observation is consistent with PLA1 and PLA2 activities from other parasites being involved in hemolysis [62–65, 87–89]. Indeed, PLA1 and PLA2 activities associated with soluble and membrane-bound fractions could induce indirect and direct hemolytic activities [105]. A PLA2 was isolated from a subcellular fraction, but solid functional genomics proofs need to be added. This eluted fraction caused hemolysis and was inhibited by Rosenthal's inhibitor [106]. The genome of *T. vaginalis* was sequenced in 2007 [107], but no PLA gene has been identified since then.

CONCLUSION

Phospholipases and lysophospholipases play a crucial role in the host-parasite interactions by performing a variety of functions. For the last few years, there has been a clear interest in the study of these enzymes, with the discovery

of new genes and new functions paving the way for further investigations. Studies have revealed their importance in the development and maintenance of protozoan pathogens inside their host, notably in common processes such as the invasion, host damages, production of active compounds and scavenging of metabolites for parasite survival. As of now, no single protozoan PLA/LysoPL has been shown to be essential. This could be explained by the fact that these parasites possess not only one but an arsenal of PLs that could compensate for the loss of one. Their roles in the virulence of these pathogens make them potential targets for drugs, vaccine or diagnostic development as

was demonstrated for several protozoan or even host PLAs [23, 32, 55, 56, 80, 81]. The genome of protozoan parasites contains several different PL and LysoPL genes, but only a few have been characterized and studied yet, as summarized in **Table 1**, making their study a future necessity. Moreover, as we saw in this review there is, in some pathogens, a complete lack of knowledge at the gene level such as in intestinal parasites. It is crucial to continue deciphering the complexity of (lyso)phospholipases to improve our understanding of protozoan parasites and possibly eliminate them.

TABLE 1. Characterized PLAs and LysoPLs of protozoan parasites.

Protozoan parasite	Genome Database	Enzyme	Database Entry	Putative function(s)	References
<i>Toxoplasma gondii</i>	ToxoDB	TgLCAT	TGME49_272420	Facilitates egress from host cells	[10, 11]
		TgPL1	TGME49_232600	Suppresses NO in macrophages, bradyzoite-to-tachyzoite reactivation	[12–14]
		TgPL2	TGME49_231370	Apicoplast maintenance, regulation of fatty acids generation and PC/LPC levels	[15]
		TgPL3	TGME49_305140	Host cell invasion, rhoptry secretion, virulence in mice	[23]
<i>Plasmodium sp.</i>	PlasmoDB	PfLPL1	PF3D7_1476700	Conversion of heme to hemozoin	[34]
		PfLPL20	PF3D7_0702200	Hydrolysis of LPC	[108]
		PbPL	PBANKA_1128100	Sporozoites migration through the epithelial layers, merozoite release from hepatocytes	[36, 37]
		PfLCAT	PF3D7_0629300	Merozoite release from hepatocytes, egress in asexual blood stage	[38]
		PbPLA1	PBANKA_1423100	Merozoite release from hepatocytes	[39]
		PfPAPTL1/PN PLA1	PF3D7_0209100	Gametocyte induction and maturation, translocation of PfPLP2 to membrane periphery	[40, 41]
<i>Trypanosoma brucei</i>	TriTrypDB	TbPLA1	Tb927.1.4830	Synthesis of LysoPC metabolites	[53, 54]
		TbLysoPLA	Tb927.8.6390	Synthesis of LysoPC metabolites	[55, 56]
<i>Trypanosoma cruzi</i>		TbGPI-PLA2	Tb927.7.6110	GPI precursor fatty acid remodeling	[61]
		TcPLA1	TcCLB.510679.100	Plasma membrane remodeling	[72–74]
<i>Leishmania sp.</i>		LmPAFAH	LmjF35.3020	Regulation of PAF levels, survival in host macrophages, mediation of LysoPC levels	[80, 81]
		LbPLA1	LBRM2903_340037900	Hydrolysis of PC	[82]
		LdLip3	LdBPK_310860.1	Host fatty acids scavenging for lipid synthesis, tissue damage	[83]
<i>Cryptosporidium</i>	CryptoDB	No enzyme characterized			
<i>Entamoeba histolytica</i>	AmoebaDB				
<i>Naegleria fowleri</i>					
<i>Giardia</i>	GiardiaDB				
<i>Trichomonas vaginalis</i>	TrichDB				

ACKNOWLEDGMENTS

Costs were supported by Université de Bordeaux (<https://www.u-bordeaux.fr>), CNRS (<https://www.cnrs.fr>) and the Agence Nationale de la Recherche through the grants GLYCONOV (grant number ANR-15-CE-15-0025-01) and ADIPOTRYP (grant number ANR19-CE15-0004-01). This work was also funded by the Laboratoire d'Excellence (LabEx) "French Parasitology Alliance For Health Care" (ANR-11-LABX-0024-PARAFRAP, <https://labex-parafrap.fr>) and the "Fondation pour le Recherche Médicale" (FRM, <https://www.frn.org/>) ("Equipe FRM", grant n°EQU201903007845). The funders had no role in decision to publish or preparation of the manuscript.

REFERENCES

- Aloulou A, Rahier R, Arhab Y, Noiriél A, and Abousalham A (2018). Phospholipases: An Overview: Methods and Protocols. In: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. pp 69–105. doi: 10.1007/978-1-4939-8672-9_3
- Aoki J, Inoue A, Makide K, Saiki N, and Arai H (2007). Structure and function of extracellular phospholipase A1 belonging to the pancreatic lipase gene family. **Biochimie**. 89(2): 197–204. doi: 10.1016/j.biochi.2006.09.021
- Burke JE, and Dennis EA (2009). Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling1. **Journal of Lipid Research**. 50: S237–S242. doi: 10.1194/jlr.R800033-JLR200
- Flores-Díaz M, Monturiol-Gross L, Naylor C, Alape-Girón A, and Flieger A (2016). Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. **Microbiol Mol Biol Rev**. 80(3): 597–628. doi: 10.1128/MMBR.00082-15
- Köhler GA, Brenot A, Haas-Stapleton E, Agabian N, Deva R, and Nigam S (2006). Phospholipase A2 and Phospholipase B Activities in Fungi. **Biochimica et biophysica acta**. 1761(11): 1391. doi: 10.1016/j.bbali.2006.09.011
- Kini RM (2006). Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem J**. 397(Pt 3): 377–387. doi: 10.1042/BJ20060302
- Verhoef JMJ, Meissner M, and Kooij TWA Organelle Dynamics in Apicomplexan Parasites. **mBio**. 12(4): e01409-21. doi: 10.1128/mBio.01409-21
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, and Tarleton R (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J Clin Invest**. 118(4): 1301–1310. doi: 10.1172/JCI33945
- Matta SK, Rinkenberger N, Dunay IR, and Sibley LD (2021). *Toxoplasma gondii* infection and its implications within the central nervous system. **Nat Rev Microbiol**. 19(7): 467–480. doi: 10.1038/s41579-021-00518-7
- Pszenny V, Ehrenman K, Romano JD, Kennard A, Schultz A, Roos DS, Grigg ME, Carruthers VB, and Coppens I (2016). A Lipolytic Lec-

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing interests.

COPYRIGHT

© 2023 Hervé *et al.* This is an open-access article released under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) license, which allows the unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are acknowledged.

Please cite this article as: Perrine Hervé, Sarah Monic, Frédéric Bringaud and Loïc Rivière (2023). Phospholipases A and Lysophospholipases in protozoan parasites. **Microbial Cell** 10(10): 204–216. doi: 10.15698/mic2023.10.805

thin:Cholesterol Acyltransferase Secreted by *Toxoplasma* Facilitates Parasite Replication and Egress. **J Biol Chem**. 291(8): 3725–3746. doi: 10.1074/jbc.M115.671974

11. Schultz AJ, and Carruthers VB (2018). *Toxoplasma gondii* LCAT Primarily Contributes to Tachyzoite Egress. **mSphere**. 3(1). doi: 10.1128/mSphereDirect.00073-18

12. Mordue DG, Scott-Weathers CF, Tobin CM, and Knoll LJ (2007). A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages: Isolation of *Toxoplasma* patatin-like protein. **Molecular Microbiology**. 63(2): 482–496. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05538.x

13. Tobin Magle C, Pittman KJ, Moser LA, Boldon KM, Knoll LJ, and Urban JF (2014). A *Toxoplasma* Patatin-Like Protein Changes Localization and Alters the Cytokine Response during Toxoplasmic Encephalitis. **Infection and Immunity**. 82(2): 618–625. doi: 10.1128/IAI.00444-13

14. Tobin CM, and Knoll LJ (2012). A Patatin-Like Protein Protects *Toxoplasma gondii* from Degradation in a Nitric Oxide-Dependent Manner. **Infection and Immunity**. 80(1): 55–61. doi: 10.1128/IAI.05543-11

15. Lévêque MF, Berry L, Yamaryo-Botté Y, Nguyen HM, Galera M, Botté CY, and Besteiro S (2017). TgPL2, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*: A phospholipase important for apicoplast homeostasis. **Molecular Microbiology**. 105(1): 158–174. doi: 10.1111/mmi.13694

16. Cassaing S, Fauvel J, Bessières MH, Guy S, Séguéla JP, and Chap H (2000). *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A(2). **Int J Parasitol**. 30(11): 1137–1142. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00101-6

17. Saffer LD, Long Krug SA, and Schwartzman JD (1989). The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Am J Trop Med Hyg**. 40(2): 145–149. doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.145

18. Thardin JF, M'Rini C, Beraud M, Vandaele J, Frisach MF, Bessières MH, Seguela JP, and Pipy B (1993). Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role

- of parasite and host cell phospholipases. **Infect Immun.** 61(4): 1432–1441. doi: 10.1128/iai.61.4.1432-1441.1993
19. Saffer LD, and Schwartzman JD (1991). A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. **J Protozool.** 38(5): 454–460. doi: 10.1111/j.1550-7408.1991.tb04816.x
20. Ossorio PN, Schwartzman JD, and Boothroyd JC (1992). A *Toxoplasma gondii* rho-try protein associated with host cell penetration has unusual charge asymmetry. **Mol Biochem Parasitol.** 50(1): 1–15. doi: 10.1016/0166-6851(92)90239-g
21. Gómez Marín JE, Bonhomme A, Guenounou M, and Pinon JM (1996). Role of interferon-gamma against invasion by *Toxoplasma gondii* in a human monocytic cell line (THP1): involvement of the parasite's secretory phospholipase A2. **Cell Immunol.** 169(2): 218–225. doi: 10.1006/cimm.1996.0112
22. Gomez-Marín JE, El'Btaouri H, Bonhomme A, Antonicelli F, Pezzella N, Bulet H, Aubert D, Villena I, Guenounou M, Haye B, and Pinon JM (2002). Involvement of secretory and cytosolic phospholipases A2 during infection of THP1 human monocytic cells with *Toxoplasma gondii*. Effect of interferon gamma. **Parasitol Res.** 88(3): 208–216. doi: 10.1007/s00436-001-0525-z
23. Wilson SK, Heckendorn J, Martorelli Di Genova B, Koch LL, Rooney PJ, Morrissette N, Lebrun M, and Knoll LJ (2020). A *Toxoplasma gondii* patatin-like phospholipase contributes to host cell invasion. **PLoS Pathog.** 16(7): e1008650. doi: 10.1371/journal.ppat.1008650
24. World Health Organization. (2022). World malaria report 2022. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/365169>. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
25. Cowman AF, Healer J, Marapana D, and Marsh K (2016). Malaria: Biology and Disease. **Cell.** 167(3): 610–624. doi: 10.1016/j.cell.2016.07.055
26. Flammersfeld A, Lang C, Flieger A, and Pradel G (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. **Int J Med Microbiol.** 308(1): 129–141. doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.015
27. Elahi R, Ray WK, Dapper C, Dalal S, Helm RF, and Klemba M (2019). Functional annotation of serine hydrolases in the asexual erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. **Sci Rep.** 9(1): 17532. doi: 10.1038/s41598-019-54009-0
28. Krugliak M, Waldman Z, and Ginsburg H (1987). Gentamicin and amikacin repress the growth of *Plasmodium falciparum* in culture, probably by inhibiting a parasite acid phospholipase. **Life Sci.** 40(13): 1253–1257. doi: 10.1016/0024-3205(87)90581-9
29. Joshi P, and Gupta CM (1988). Abnormal membrane phospholipid organization in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. **Br J Haematol.** 68(2): 255–259. doi: 10.1111/j.1365-2141.1988.tb06198.x
30. Zidovetzki R, Sherman IW, and O'Brien L (1993). Inhibition of *Plasmodium falciparum* phospholipase A2 by chloroquine, quinine, and arteether. **J Parasitol.** 79(4): 565–570. PMID: 8331477
31. Zidovetzki R, Sherman IW, Prudhomme J, and Crawford J (1994). Inhibition of *Plasmodium falciparum* lysophospholipase by anti-malarial drugs and sulphhydryl reagents. **Parasitology.** 108 (Pt 3): 249–255. doi: 10.1017/s0031182000076095
32. Wagner MP, Formaglio P, Gorgette O, Dziekan JM, Huon C, Berneburg I, Rahlfs S, Barale J-C, Feinstein SI, Fisher AB, Ménard D, Bozdech Z, Amino R, Touqui L, and Chitnis CE (2022). Human peroxiredoxin 6 is essential for malaria parasites and provides a host-based drug target. **Cell Reports.** 39(11): 110923. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110923
33. Brancucci NMB, Gerdt JP, Wang C, De Niz M, Philip N, Adapa SR, Zhang M, Hitz E, Niederwieser I, Boltryk SD, Laffitte M-C, Clark MA, Grüning C, Ravel D, Blancke Soares A, Demas A, Bopp S, Rubio-Ruiz B, Conejo-Garcia A, Wirth DF, Gendaszewska-Darmach E, Duraisingh MT, Adams JH, Voss TS, Waters AP, Jiang RHY, Clardy J, and Marti M (2017). Lysophosphatidylcholine Regulates Sexual Stage Differentiation in the Human Malaria Parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell.** 171(7): 1532-1544.e15. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.020
34. Asad M, Yamaryo-Botté Y, Hossain ME, Thakur V, Jain S, Datta G, Botté CY, and Mohammed A (2021). An essential vesicular-trafficking phospholipase mediates neutral lipid synthesis and contributes to hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. **BMC Biol.** 19: 159. doi: 10.1186/s12915-021-01042-z
35. Sheokand PK, Narwal M, Thakur V, and Mohammed A (2021). GImS mediated knock-down of a phospholipase expedite alternate pathway to generate phosphocholine required for phosphatidylcholine synthesis in *Plasmodium falciparum*. **Biochemical Journal.** 478(18): 3429–3444. doi: 10.1042/BCJ20200549
36. Bhanot P, Schauer K, Coppens I, and Nussenzweig V (2005). A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. **J Biol Chem.** 280(8): 6752–6760. doi: 10.1074/jbc.M411465200
37. Burda P-C, Roelli MA, Schaffner M, Khan SM, Janse CJ, and Heussler VT (2015). A *Plasmodium* Phospholipase Is Involved in Disruption of the Liver Stage Parasitophorous Vacuole Membrane. **PLoS Pathog.** 11(3): e1004760. doi: 10.1371/journal.ppat.1004760
38. Ramaprasad A, Burda P-C, Koussis K, Thomas JA, Pietsch E, Calvani E, Howell SA, MacRae JI, Snijders AP, Gilberger T-W, and Blackman MJ (2023). A malaria parasite phospholipase facilitates efficient asexual blood stage egress. **PLoS Pathog.** 19(6): e1011449. doi: 10.1371/journal.ppat.1011449
39. Srivastava PN, and Mishra S (2022). Disrupting a *Plasmodium berghei* putative phospholipase impairs efficient egress of merozoites. **Int J Parasitol.** 52(8): 547–558. doi: 10.1016/j.ijpara.2022.03.002
40. Singh P, Alaganan A, More KR, Lorthiois A, Thiberge S, Gorgette O, Guillotte Blisnick M, Guglielmini J, Aguilera SS, Touqui L, Singh S, and Chitnis CE (2019). Role of a patatin-like phospholipase in *Plasmodium falciparum* gametogenesis and malaria transmission. **Proc Natl Acad Sci USA.** 116(35): 17498–17508. doi: 10.1073/pnas.1900266116
41. Flammersfeld A, Panyot A, Yamaryo-Botté Y, Aurass P, Przyborski JM, Flieger A, Botté C, and Pradel G (2020). A patatin-like phospholipase functions during gametocyte induction in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cellular Microbiology.** 22(3): e13146. doi: 10.1111/cmi.13146

42. Dumaine JE, Tandel J, and Striepen B (2020). *Cryptosporidium parvum*. **Trends in Parasitology**. 36(5): 485–486. doi: 10.1016/j.pt.2019.11.003
43. Pollok RCG, McDonald V, Kelly P, and Farthing MJG (2003). The role of *Cryptosporidium parvum*-derived phospholipase in intestinal epithelial cell invasion. **Parasitol Res**. 90(3): 181–186. doi: 10.1007/s00436-003-0831-8
44. Kennedy PGE (2019). Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **J Neurol**. 266(9): 2334–2337. doi: 10.1007/s00415-019-09425-7
45. Desquesnes M, Gonzatti M, Sazmand A, Thévenon S, Bossard G, Boulangé A, Gimonneau G, Truc P, Herder S, Ravel S, Sereno D, Jamonneau V, Jittapalpong S, Jacquiet P, Solano P, and Berthier D (2022). A review on the diagnosis of animal trypanosomoses. **Parasit Vectors**. 15: 64. doi: 10.1186/s13071-022-05190-1
46. Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, DE Koning HP, and Barrett MP (2016). The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: a review. **Parasitology**. 143(14): 1862–1889. doi: 10.1017/S0031182016001268
47. Hambrey PN, Mellors A, and Tizard IR (1981). The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. **Mol Biochem Parasitol**. 2(3–4): 177–186. doi: 10.1016/0166-6851(81)90098-0
48. Opperdoes FR, and van Roy J (1982). The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics. **Mol Biochem Parasitol**. 5(5): 309–319. doi: 10.1016/0166-6851(82)90038-x
49. Hambrey PN, Tizard IR, and Mellors A (1980). Accumulation of phospholipase A1 in tissue fluid of rabbits infected with *Trypanosoma brucei*. **Tropenmed Parasitol**. 31(4): 439–443. PMID: 7233541
50. Bowes AE, Samad AH, Jiang P, Weaver B, and Mellors A (1993). The acquisition of lysophosphatidylcholine by African trypanosomes. **J Biol Chem**. 268(19): 13885–13892. PMID: 8314756
51. Masterson WJ, Raper J, Doering TL, Hart GW, and Englund PT (1990). Fatty acid remodeling: A novel reaction sequence in the biosynthesis of trypanosome glycosyl phosphatidylinositol membrane anchors. **Cell**. 62(1): 73–80. doi: 10.1016/0092-8674(90)90241-6
52. Sage L, Hambrey PN, Werchola GM, Mellors A, and Tizard IR (1981). Lysophospholipase 1 in *Trypanosoma brucei*. **Tropenmed Parasitol**. 32(4): 215–220. PMID: 7345684
53. Richmond GS, and Smith TK (2007). A novel phospholipase from *Trypanosoma brucei*. **Molecular Microbiology**. 63(4): 1078–1095. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05582.x
54. Richmond GS, and Smith TK (2007). The role and characterization of phospholipase A1 in mediating lysophosphatidylcholine synthesis in *Trypanosoma brucei*. **Biochem J**. 405(2): 319–329. doi: 10.1042/BJ20070193
55. Monic SG, Lamy A, Thonnus M, Bizarra-Rebello T, Bringaud F, Smith TK, Figueiredo LM, and Rivière L (2022). A novel lipase with dual localisation in *Trypanosoma brucei*. **Sci Rep**. 12(1): 4766. doi: 10.1038/s41598-022-08546-w
56. Tounkara M, Boulangé A, Thonnus M, Bringaud F, Bélem AMG, Bengaly Z, Thévenon S, Berthier D, and Rivière L (2021). Novel protein candidates for serodiagnosis of African animal trypanosomosis: Evaluation of the diagnostic potential of lysophospholipase and glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. **PLoS Negl Trop Dis**. 15(12): e0009985. doi: 10.1371/journal.pntd.0009985
57. Eintracht J, Maathai R, Mellors A, and Ruben L (1998). Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A2 and arachidonic acid. **Biochem J**. 336 (Pt 3): 659–666. doi: 10.1042/bj3360659
58. Catisti R, Uyemura SA, Docampo R, and Vercesi AE (2000). Calcium mobilization by arachidonic acid in trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol**. 105(2): 261–271. doi: 10.1016/s0166-6851(99)00186-3
59. Das UN (2021). Essential Fatty Acids and Their Metabolites in the Pathobiology of Inflammation and Its Resolution. **Biomolecules**. 11(12): 1873. doi: 10.3390/biom11121873
60. Ridgley EL, and Ruben L (2001). Phospholipase from *Trypanosoma brucei* releases arachidonic acid by sequential sn-1, sn-2 deacylation of phospholipids. **Mol Biochem Parasitol**. 114(1): 29–40. doi: 10.1016/s0166-6851(01)00234-1
61. Ji Z, Nagar R, Duncan SM, Sampaio Guther ML, and Ferguson MAJ (2023). Identification of the glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase A2 (GPI-PLA2) that mediates GPI fatty acid remodeling in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem**. 105016. doi: 10.1016/j.jbc.2023.105016
62. Tizard I, Nielsen KH, Seed JR, and Hall JE (1978). Biologically active products from African Trypanosomes. **Microbiol Rev**. 42(4): 664–681. doi: 10.1128/mr.42.4.664-681.1978
63. Tizard IR, and Holmes WL (1976). The generation of toxic activity from *Trypanosoma congolense*. **Experientia**. 32(12): 1533–1534. doi: 10.1007/BF01924436
64. Tizard IR, Holmes WL, and Nielsen K (1978). Mechanisms of the anemia in trypanosomiasis: studies on the role of the hemolytic fatty acids derived from *Trypanosoma congolense*. **Tropenmed Parasitol**. 29(1): 108–114. PMID: 644654
65. Tizard IR, Mellors A, Holmes WL, and Nielsen K (1978). The generation of phospholipase A and hemolytic fatty acids by autolysing suspensions of *Trypanosoma congolense*. **Tropenmed Parasitol**. 29(1): 127–133. PMID: 347651
66. Nok AJ, Esievo KA, Ibrahim S, Ukoha AI, and Ikediobi CO (1993). Phospholipase A2 from *Trypanosoma congolense*: characterization and haematological properties. **Cell Biochem Funct**. 11(2): 125–130. doi: 10.1002/cbf.290110208
67. Rios LE, Vázquez-Chagoyán JC, Pacheco AO, Zago MP, and Garg NJ (2019). Immunity and vaccine development efforts against *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop**. 200: 105168. doi: 10.1016/j.actatropica.2019.105168
68. Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, de Isola ED, Lammel E, Meinardi E, Brenner RR, and Rasmussen L (1997). Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 88(1): 25–33. doi: 10.1016/S0166-6851(97)00056-X

69. Bertello LE, Alves MJ, Colli W, and de Lederkremer RM (2000). Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. **Biochem J.** 345 Pt 1: 77–84. doi: 10.1042/0264-6021:3450077
70. Salto ML, Bertello LE, Vieira M, Docampo R, Moreno SNJ, and de Lederkremer RM (2003). Formation and remodeling of inositol-phosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote. **Eukaryot Cell.** 2(4): 756–768. doi: 10.1128/EC.2.4.756-768.2003
71. Connelly MC, and Kierszenbaum F (1984). Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A₂-sensitive components of the parasite membrane. **Biochem Biophys Res Commun.** 121(3): 931–939. doi: 10.1016/0006-291x(84)90766-6
72. Wainszelbaum M, Isola E, Wilkowsky S, Cannata JJ, Florin-Christensen J, and Florin-Christensen M (2001). Lysosomal phospholipase A1 in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in the pathogenesis of Chagas' disease. **Biochem J.** 355(Pt 3): 765–770. doi: 10.1042/bj3550765
73. Belaunzarán ML, Wainszelbaum MJ, Lammel EM, Gimenez G, Aloise MM, Florin-Christensen J, and Isola ELD (2007). Phospholipase A₁ from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c. **Parasitology.** 134(4): 491–502. doi: 10.1017/S0031182006001740
74. Belaunzarán ML, Wilkowsky SE, Lammel EM, Bott E, Barbieri MA, and Durante de Isola EL (2013). Phospholipase A1: A novel virulence factor in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 187(2): 77–86. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.12.004
75. Burza S, Croft SL, and Boelaert M (2018). Leishmaniasis. **Lancet.** 392(10151): 951–970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2
76. Henriques C, Atella G, Bonilha V, and de Souza W (2003). Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res.** 89(2): 123–133. doi: 10.1007/s00436-002-0728-y
77. Chaves MM, Canetti C, and Coutinho-Silva R (2016). Crosstalk between purinergic receptors and lipid mediators in leishmaniasis. **Parasit Vectors.** 9(1): 489. doi: 10.1186/s13071-016-1781-1
78. Passero LFD, Laurenti MD, Tomokane TY, Corbett CEP, and Toyama MH (2008). The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitol Res.** 102(5): 1025–1033. doi: 10.1007/s00436-007-0871-6
79. Bordon MLAC, Laurenti MD, Ribeiro SP, Toyama MH, Toyama D de O, and Passero LFD (2018). Effect of phospholipase A2 inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** 24: 21. doi: 10.1186/s40409-018-0156-9
80. Pawlowic MC, and Zhang K (2012). *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence. **Molecular and Biochemical Parasitology.** 186(1): 11–20. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.08.005
81. Goswami A, Koley T, Rajan MV, Madhuri P, Upadhyay N, Das U, Kumar M, Ethayathulla AS, and Hariprasad G (2023). Structural Modelling of Platelet Activating Factor Acetyl Hydrolase in *Leishmania* donovani, *Trypanosoma cruzi*, and *Trypanosoma brucei*: Implications on Therapeutics for Leishmaniasis, Chagas Disease, and Sleeping Sickness. **Infect Drug Resist.** 16: 2117–2128. doi: 10.2147/IDR.S403411
82. Bott E, López MG, Lammel EM, Carfagna IE, Durante de Isola EL, Ruybal P, Taboga O, Gimenez G, and Belaunzarán ML (2020). Cellular localization, cloning and expression of *Leishmania braziliensis* Phospholipase A1. **Microb Pathog.** 141: 104010. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104010
83. Shakarian AM, McGugan GC, Joshi MB, Stromberg M, Bowers L, Ganim C, Barowski J, and Dwyer DM (2010). Identification, characterization, and expression of a unique secretory lipase from the human pathogen *Leishmania donovani*. **Mol Cell Biochem.** 341(1–2): 17–31. doi: 10.1007/s11010-010-0433-6
84. Gorman H, and Chadee K (2019). *Entamoeba histolytica*: Biology and Host Immunity. In: Reference Module in Life Sciences. Elsevier; p B9780128096338907000. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.90748-9
85. Ravdin JI, Murphy CF, Guerrant RL, and Long-Krug SA (1985). Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. **J Infect Dis.** 152(3): 542–549. doi: 10.1093/infdis/152.3.542
86. Long-Krug SA, Fischer KJ, Hysmith RM, and Ravdin JI (1985). Phospholipase A enzymes of *Entamoeba histolytica*: description and subcellular localization. **J Infect Dis.** 152(3): 536–541. doi: 10.1093/infdis/152.3.536
87. Said-Fernández S, and López-Revilla R (1982). Subcellular distribution and stability of the major hemolytic activity of *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Z Parasitenkd.** 67(3): 249–254. doi: 10.1007/BF00927659
88. Said-Fernández S, and López-Revilla R (1983). Latency and heterogeneity of *Entamoeba histolytica* hemolysins. **Z Parasitenkd.** 69(4): 435–438. doi: 10.1007/BF00927699
89. Said-Fernández S, and López-Revilla R (1988). Free fatty acids released from phospholipids are the major heat-stable hemolytic factor of *Entamoeba histolytica* trophozoites. **Infect Immun.** 56(4): 874–879. doi: 10.1128/iai.56.4.874-879.1988
90. Vargas-Villarreal J, Martínez-Rodríguez H, Castro-Garza J, Mata-Cárdenas BD, González-Garza MT, and Said-Fernández S (1995). Identification of *Entamoeba histolytica* intracellular phospholipase A and lysophospholipase L1 activities. **Parasitol Res.** 81(4): 320–323. doi: 10.1007/bf00931538
91. González-Garza MT, Castro-Garza J, Cruz-Vega DE, Vargas-Villarreal J, Carranza-Rosales P, Mata-Cárdenas BD, Siller-Campos L, and Said-Fernández S (2000). *Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A(2), and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures. **Exp Parasitol.** 96(2): 116–119. doi: 10.1006/expr.2000.4554
92. Loftus B et al. (2005). The genome of the protist parasite *Entamoeba histolytica*. **Nature.** 433(7028): 865–868. doi: 10.1038/nature03291
93. Anderson DM, Sato H, Dirck AT, Feix JB, and Frank DW (2015). Ubiquitin activates patatin-like phospholipases from multiple bacterial species. **J Bacteriol.** 197(3): 529–541. doi: 10.1128/JB.02402-14

94. Hysmith RM, and Franson RC (1982). Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. **Biochim Biophys Acta**. 711(1): 26–32. doi: 10.1016/0005-2760(82)90005-4
95. Hysmith RM, and Franson RC (1982). Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. **Biochim Biophys Acta**. 712(3): 698–701. doi: 10.1016/0005-2760(82)90300-9
96. Fulford DE, and Marciano-Cabral F (1986). Cytolytic activity of *Naegleria fowleri* cell-free extract. **J Protozool**. 33(4): 498–502. doi: 10.1111/j.1550-7408.1986.tb05649.x
97. Barbour SE, and Marciano-Cabral F (2001). *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). **Biochim Biophys Acta**. 1530(2–3): 123–133. doi: 10.1016/s1388-1981(00)00069-x
98. Cernikova L, Faso C, and Hehl AB (2018). Five facts about *Giardia lamblia*. **PLoS Pathog**. 14(9): e1007250. doi: 10.1371/journal.ppat.1007250
99. Vargas-Villarreal J, Escobedo-Guajardo BL, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, Cortes-Gutiérrez E, Morales-Vallarta M, Sampayo-Reyes A, and Said-Fernández S (2007). ACTIVITY OF INTRACELLULAR PHOSPHOLIPASE A₁ AND A₂ IN GIARDIA LAMBLIA. **Journal of Parasitology**. 93(5): 979–984. doi: 10.1645/GE-1038R3.1
100. Mata-Cárdenas B, Hernández-García M, González-Salazar F, Garza-González J, Palacios-Corona R, Cortés-Gutiérrez E, and Vargas-Villarreal J (2012). Axenic cultivation and comparative phospholipase A2 activity of *Giardia duodenalis* in a serum-free medium. **Acta Parasitologica**. 57(3). doi: 10.2478/s11686-012-0035-4
101. Hahn J, Seeber F, Kolodziej H, Ignatius R, Laue M, Aebischer T, and Klotz C (2013). High Sensitivity of *Giardia duodenalis* to Tetrahydrolipstatin (Orlistat) In Vitro. **PLoS One**. 8(8): e71597. doi: 10.1371/journal.pone.0071597
102. Edwards T, Burke P, Smalley H, and Hobbs G (2014). *Trichomonas vaginalis*: Clinical relevance, pathogenicity and diagnosis. **Critical Reviews in Microbiology**. 1–12. doi: 10.3109/1040841X.2014.958050
103. McGregor JA, French JI, Jones W, Parker R, Patterson E, and Draper D (1992). Association of cervicovaginal infections with increased vaginal fluid phospholipase A2 activity. **Am J Obstet Gynecol**. 167(6): 1588–1594. doi: 10.1016/0002-9378(92)91746-w
104. Lubick KJ, and Burgess DE (2004). Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. **Infect Immun**. 72(3): 1284–1290. doi: 10.1128/iai.72.3.1284-1290.2004
105. Vargas-Villarreal J, Mata-Cárdenas BD, Palacios-Corona R, González-Salazar F, Cortes-Gutiérrez EI, Martínez-Rodríguez HG, and Said-Fernández S (2005). *Trichomonas vaginalis*: Identification of soluble and membrane-associated phospholipase A₁ and A₂ activities with direct and indirect hemolytic effects. **Journal of Parasitology**. 91(1): 5–11. doi: 10.1645/GE-3338
106. Escobedo-Guajardo B, González-Salazar F, Palacios-Corona R, Torres de la Cruz V, Morales-Vallarta M, Mata-Cárdenas B, Garza-González J, Rivera-Silva G, and Vargas-Villarreal J (2013). *Trichomonas vaginalis* acidic phospholipase A2: isolation and partial amino acid sequence. **Acta Parasitologica**. 58(4). doi: 10.2478/s11686-013-0166-2
107. Carlton JM et al. (2007). Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. **Science**. 315(5809): 207–212. doi: 10.1126/science.1132894
108. Pk S, M N, V T, and A M (2021). GImS mediated knock-down of a phospholipase expedite alternate pathway to generate phosphocholine required for phosphatidylcholine synthesis in *Plasmodium falciparum*. **The Biochemical journal**. 478(18). doi: 10.1042/BCJ20200549

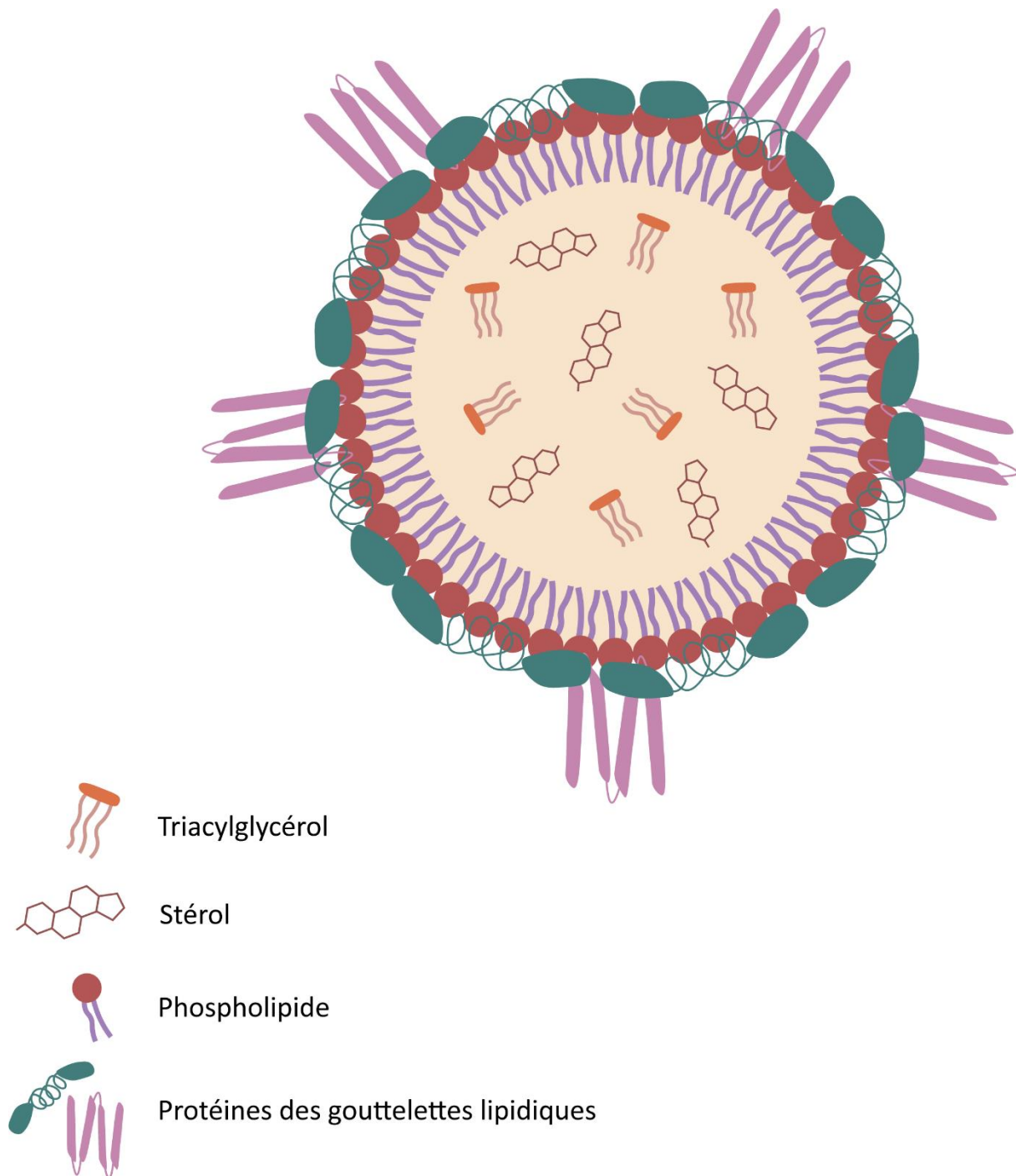


Figure 20 : Schéma d'une gouttelette lipidique.

L'intérieur des gouttelettes lipidiques est uniquement composé de lipides neutres, essentiellement des triacylglycérols et des esters de stérol. Les lipides sont séparés du cytosol par une monocouche de phospholipides formant la membrane de la gouttelette lipidique. Des protéines spécifiques couvrent la surface de la gouttelette. Réalisé sur Illustrator.

1.3. Les gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (LD, *lipid droplet*), également appelées corps lipidiques, adiposomes ou liposomes, sont des organites dont la fonction principale est le stockage temporaire de lipides neutres. Les LD sont retrouvées chez tous les eucaryotes ; chez les organismes multicellulaires, le stockage des lipides est d'ailleurs centralisé dans des tissus dédiés, comme le tissu adipeux chez les mammifères, qui stocke la majorité des TAG et autres lipides neutres de l'organisme grâce aux LD. Toutes les cellules d'un organisme sont cependant capables d'en produire (Walther, Chung, et Farese 2017; Henne 2023). Alors que la majorité des compartiments cellulaires sont liés par une bicouche de PL, les LD ont la particularité d'être entourées d'une monocouche de PL dont les composants majeurs chez les mammifères sont la PC et la PE (Walther, Chung, et Farese 2017). Autour de cette membrane se trouvent des protéines impliquées dans la maintenance des LD, le métabolisme lipidique et l'interaction avec d'autres compartiments cellulaires. L'intérieur de ces organites est composé de lipides neutres, essentiellement des TAG et esters de stérol (Figure 20) (Walther, Chung, et Farese 2017).

Le rôle « historique » des LD étant le 'simple' stockage passif de lipides, l'étude de ces organites à pendant longtemps été délaissée et l'importance des LD sous-estimée. Cependant, l'intérêt grandissant de la recherche pour les maladies métaboliques et l'obésité ces dernières décennies a permis de nouvelles découvertes sur les LD, leur fonctionnement et leurs rôles dans de nombreuses maladies (Coleman 2020). En effet, chez l'humain, des dérèglements chez les LD et des mutations dans les gènes codants pour des protéines associées à ce compartiment sont retrouvées dans plusieurs maladies métaboliques. Très généralement, un excès de LD est associé à l'obésité due notamment à l'accumulation de lipides dans des tissus : par exemple, l'accumulation de larges LD dans les hépatocytes est caractéristique de la stéatose hépatique non alcoolique (Zhang et al. 2024). À l'inverse, un manque ou une absence de LD dans les cellules cause une mauvaise répartition du tissu adipeux dans le corps ; on parle alors de lipodystrophie (Duan et Savage 2023). On retrouve l'implication des LD dans des maladies comme le diabète de type 2, la résistance à l'insuline, mais également dans des cancers et maladies neuronales (Bohnert et Schrul 2024).

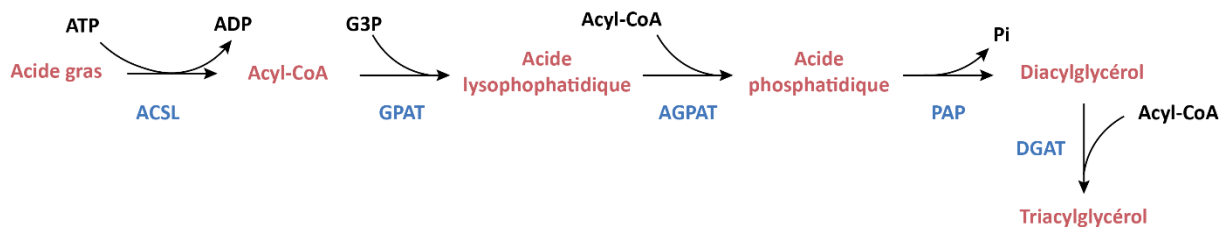


Figure 21 : synthèse des TAG dans le réticulum endoplasmique chez les mammifères.

ACSL, acyl-CoA synthétase ; GPAT, glycérol-3-phosphate acyltransférase ; G3P, glycérol 3-phosphate ; AGPAT, acylglycérol-phosphate acyltransférase ; PAP, phosphatase de l'acide phosphatidique (lipin) ; Pi, phosphate inorganique ; DGAT, diacylglycérol acyltransférase. Réalisé sur Illustrator.

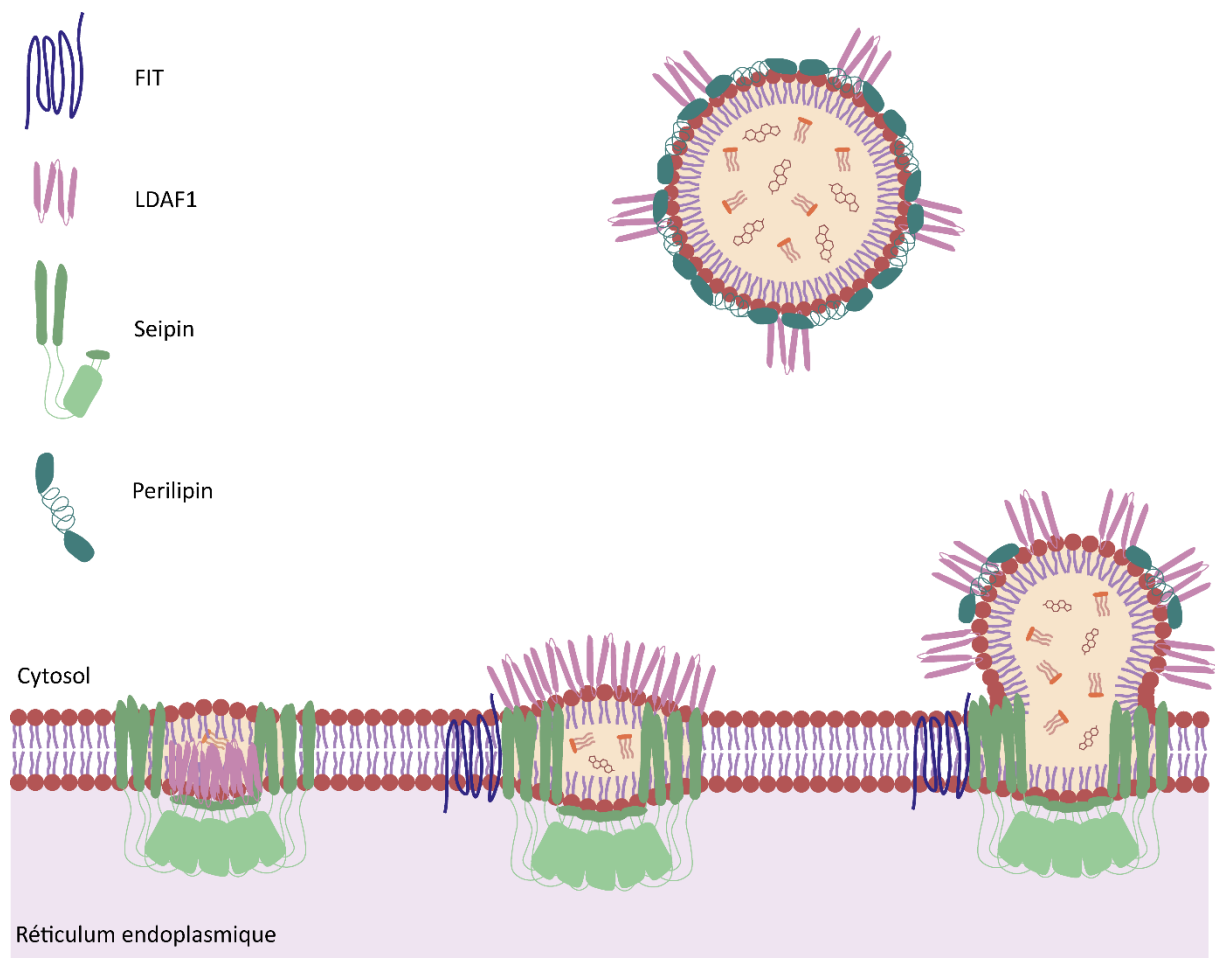


Figure 22 : Biogénèse des gouttelettes lipidique chez l'Homme.

Les TAG et esters de stérol s'accumulent localement dans la membrane du réticulum endoplasmique. Les protéines Seipin et LDAF1 forment un complexe facilitant la formation des gouttelettes. Les protéines FIT se lient aux DAG pour faciliter le bourgeonnement des gouttelettes. Les gouttelettes sont libérées dans le cytosol et des protéines s'accumulent à leur surface (Perilipin, LDAF1...). Réalisé sur Illustrator.

Des études ont aussi montré l'implication des LD dans le stockage temporaire de protéines et leur dégradation (Choudhary et Goodman 2023) ainsi que des rôles lors de la réponse inflammatoire contre les pathogènes (Bosch et al. 2021; Tavares et al. 2022; Tan et al. 2023). Les LD forment en effet un site de production des éicosanoïdes chez les leucocytes (macrophages, neutrophiles...). Les gouttelettes répondent à des stimuli comme les PAF, les hormones ou cytokines inflammatoires ; elles peuvent incorporer l'acide arachidonique exogène et forment des réservoirs de lipides arachidonyles, précurseurs de la synthèse d'éicosanoïdes. Les enzymes nécessaires à la production de ces médiateurs inflammatoires, comme les PG synthases, sont également retrouvées au niveau des LD lors d'infections (Bozza et al. 2011; Melo et al. 2011).

Ainsi, le rôle des LD ne se limite pas à un stockage passif des lipides : la présence de ces organites permet un maintien de l'homéostasie énergétique et la réponse au stress du réticulum endoplasmique lors d'un excès d'apport d'acides gras. Les LD sont très dynamiques et leur nombre, taille, composition et interactions avec les autres compartiments sont constamment adaptés pour faire face aux changements métaboliques et énergétiques de l'organisme.

1.3.1. Biogenèse des gouttelettes lipidiques

L'existence des LD est régie par l'offre et la demande ; elles émergent et sont dégradées selon les apports et besoins en acides gras/lipides de la cellule et l'organisme en général. En amont de leur biogenèse, les acides gras importés dans les cellules passent dans le RE et sont utilisés pour synthétiser des TAG. Chez l'Homme, cette biosynthèse a lieu lors d'une suite de réactions enzymatiques (Figure 21). Chez les levures, la synthèse des TAG se fait par les protéines Lro1 et Dga1. Lro1, une lécithine cholestérol acyltransférase, synthétise les TAG par transestérification d'un acide gras de PL vers un DAG, tandis que Dga1 possède une activité similaire aux enzymes DGAT (Figure 21) (Jacquier et al. 2011). Les esters de stérol sont également formés dans le RE par les enzymes Are1 et Are2 chez les levures et par des acyl-CoA:cholestérol acyltransférases (ACAT) chez les mammifères (Yang et al. 1996; Oelkers et al. 1998). Les TAG et stérols synthétisés s'accumulent dans la bicouche de PL du RE et s'agrègent, augmentant la concentration locale de lipides neutres. Une « lentille » se forme alors entre les deux couches de PL entourant le RE lorsque la concentration atteint un seuil critique (Figure 22) (Henne 2023).

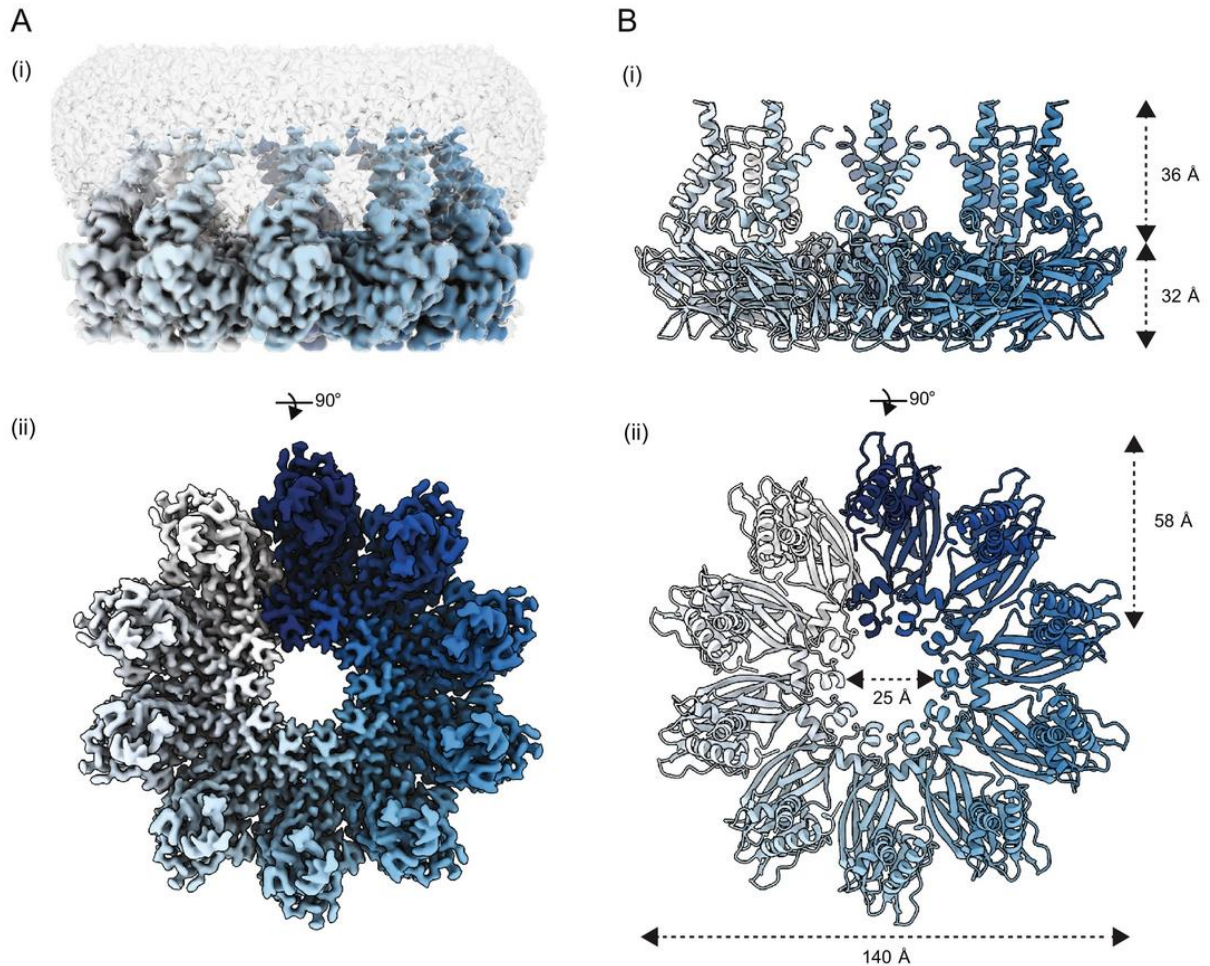


Figure 23 : Structure de cryo-microscopie électronique (Cryo-EM) et modèle de l'homodécamère de la protéine Seipin de *Saccharomyces cerevisiae* (Sei1).

A. Carte Cryo-EM d'un homodécamère de Sei1 (bleu) (i) vue de côté du décimère entourant une micelle (gris) (ii) vue de dessus. **B.** Représentation du modèle de l'homodécamère vu de (i) côté et (ii) de dessus. Å, Armstrong (Klug et al. 2021).

La protéine clé dans la biologie des gouttelettes lipidiques et critique pour leur formation est Seipin (gène *BSCL2* chez l'Homme, *Fld1p* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*). Cette protéine transmembranaire résidente du RE est retrouvée à l'interface entre le RE et les LD naissantes et contrôle le bourgeonnement de nouvelles LD (Szymanski et al. 2007). La protéine forme des homo-oligomères (Figure 23) et est attachée à un partenaire, LDAF1 (*lipid droplet assembly factor 1*) chez l'Homme et les protéines Ldo (*lipid droplet organization*) chez *S. cerevisiae* (Chung et al. 2019; Eisenberg-Bord et al. 2017). Chez la levure, Seipin requiert un autre partenaire, Ldb16 (*lipid droplet biogenesis of 16 kDa*) (Klug et al. 2021). Le complexe Seipin – LDAF1 ou Seipin – Ldo – Ldb16 est appelé LDAC (*lipid droplet assembly complex*). Des mutations délétères dans la séquence codante de *BSCL2* causent une lipodystrophie généralisée congénitale aussi appelée syndrome de Berardinelli-Seip. Cette maladie est caractérisée par une absence presque totale de tissu adipeux et une insuffisance d'insuline sévère (Magré et al. 2001). Au niveau cellulaire, la délétion de Seipin a pour conséquence l'apparition de gouttelettes lipidiques hétéromorphes selon les conditions de culture ; les LD sont soit très peu nombreuses et plus grosses, ou très nombreuses et plus petites (Fei et al. 2008; Szymanski et al. 2007). Seipin et son partenaire déterminent les points de bourgeonnement des nouvelles LD à partir de la membrane du RE. Les LDAC permettent de diminuer la concentration nécessaire de TAG pour la formation des LD et sont capables de contrer le phénomène biophysique de murissement d'Ostwald, selon lequel les molécules d'huiles diffusent d'une petite goutte vers une plus grosse dues aux différences de pression (Salo et al. 2019).

Le bourgeonnement des LD à partir du RE dépend également d'autres protéines, dont les protéines FIT (*fat-storage-inducing transmembrane protein*). La protéine humaine FIT2 est capable de se lier aux DAG et aux TAG (Gross, Zhan, et Silver 2011). Chez *S. cerevisiae*, les protéines FIT facilitent le bourgeonnement des LD à partir du RE et leur délétion bloque les LD dans la double membrane du RE, où sont retrouvés des niveaux significativement plus élevés de DAG (Choudhary et al. 2015). Chez la souris et l'Homme, il a également été observé que les mutations délétères des protéines FIT ont pour conséquence une réduction importante du nombre voire une absence de LD dans le cytoplasme (Kadereit et al. 2008; Goh et al. 2015). Les protéines FIT permettent ainsi l'émergence des LD à partir du RE en réduisant les niveaux de DAG libres dans le RE (Choudhary et al. 2018).

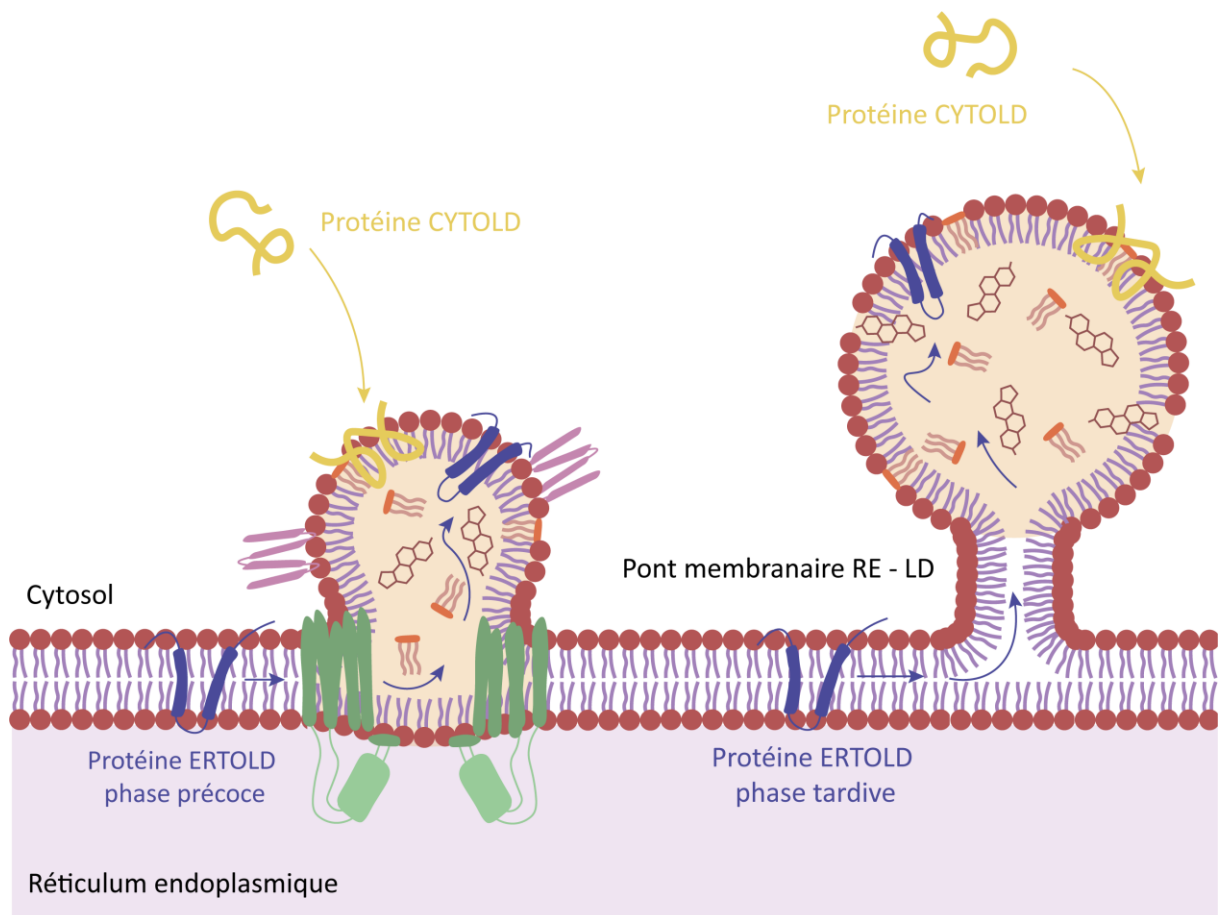


Figure 24 : les voies d'adressage des protéines aux gouttelettes lipidiques.

Les protéines ayant pour localisation la surface des gouttelettes lipidiques utilisent soit la voie CYTOLD (*cytosol to lipid droplet*, protéine jaune), soit la voie ERTOLD (*endoplasmic reticulum to lipid droplet*, protéine bleue). La voie ERTOLD est séparée en deux phases : la phase précoce, qui permet le déplacement des protéines du RE vers les LD pendant le bourgeonnement de la gouttelette, et la phase tardive, lors des points de contact entre le RE et les LD après bourgeonnement des LD dans le cytosol. Réalisé sur Illustrator.

En lien avec ces observations, les protéines mammifères PAP, aussi appelées lipins, et leur orthologue chez *S. cerevisiae* Pah1p, produisent des DAG à partir d'acide phosphatidique (Figure 21) et sont importantes pour la biogenèse des LD (Adeyo et al. 2011; Karanasios et al. 2013).

Chez les levures, les LD restent attachées au RE et ne sont pas libérées dans le cytosol (Jacquier et al. 2011). Dans les cellules humaines, les LD se détachent du RE après biogénèse mais plusieurs études ont montré l'existence de points de contact entre le RE et les LD, appelés ponts membranaires, après le bourgeonnement des LD dans le cytosol (Robenek et al. 2006; Wilfling et al. 2013; Salo et al. 2016; 2019). Chez les cellules de *Drosophila*, les LD sont libérées dans le cytosol et reconnectent plus tard avec le RE, permettant le trafic d'enzymes de synthèse des TAG du RE vers les LD (Wilfling et al. 2013). Chez les eucaryotes supérieurs, il n'y a cependant pas de consensus sur la continuité, la maintenance et l'abondance des contacts RE – LD (Hugenroth et Bohnert 2020; Walther, Chung, et Farese 2017; Olarte et al. 2022). Les LD nouvellement bourgeonnées ont un diamètre compris entre 300 et 600 nm (Kory, Farese, et Walther 2016).

1.3.2. Adressage des protéines aux gouttelettes lipidiques

Il n'existe pas de séquence connue permettant l'adressage spécifique et direct des protéines à la surface des LD. Pour arriver à destination, les protéines doivent emprunter l'une des deux voies disponibles pour l'adressage aux LD : ERTOLD pour *Endoplasmic Reticulum TO Lipid Droplet*, ou CYTOLD pour *Cytosol TO Lipid Droplet*. Les protéines utilisant la voie ERTOLD sont appelées protéines de classe I, tandis que les protéines empruntant la voie CYTOLD sont dites de classe II (Kory, Farese, et Walther 2016).

1.3.2.1. Protéines de classe I et la voie ERTOLD

Après traduction, les protéines utilisant la voie ERTOLD s'ancrent dans la bicouche membranaire du RE grâce à la présence d'une séquence hydrophobe leur conférant une structure en épingle à cheveux. Lors de la formation des LD, les protéines migrent vers la gouttelette naissante. La présence de résidus comme les tryptophanes, qui interagissent avec la tête hydrophile des PL formant la membrane des LD ou encore avec le squelette glycérol des TAG, favoriserait ce déplacement (Olarte et al. 2020; 2022).

Après bourgeonnement, les ponts membranaires entre le RE et les LD permettent la migration d'autres protéines (Figure 24) (Salo et al. 2016; Wilfling et al. 2013).

On peut ainsi séparer dans le temps la migration des protéines du RE vers les LD : le ciblage dit « précoce », où les protéines s'installent à la surface des LD lors de leur formation, et le ciblage « tardif », où les protéines migrent vers les LD après bourgeonnement en utilisant les points de contact RE – LD (Song et al. 2022). Concernant le ciblage précoce, le mécanisme n'est pas connu, mais impliquerait les LDAC et plus spécifiquement Seipin, dont la structure permettrait le passage de protéines spécifiques (Figure 23) (Sui et al. 2018; Yan et al. 2018; Arlt et al. 2022). Le mécanisme de translocation des protéines tardives du RE vers les LD chez *Drosophila* est indépendant de Seipin. Les points de contact RE – LD sont retrouvés au niveau de domaines appelés sites d'export du RE, ou ERES (*endoplasmic reticulum exit sites*), d'où des vésicules transportant des protéines émergent à destination de l'appareil de Golgi (Bannykh, Rowe, et Balch 1996; Song et al. 2022). Plusieurs protéines impliquées dans le transport vésiculaire et les domaines ERES, telles que les protéines Rab et SNAREs (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*), apparaissent nécessaires à la formation de ces points de contact RE – LD aux domaines ERES et au ciblage tardif (Song et al. 2022). Ces expériences sont cependant limitées à la protéine GPAT4 (glycérol-3-phosphate acyltransférase 4) de la drosophile. La ségrégation temporelle des protéines pourrait favoriser le bourgeonnement en évitant une accumulation de protéines à la surface des LD émergentes (Kory et al. 2015). De plus, de nombreuses protéines à ciblage tardif sont impliquées dans le métabolisme lipidique : PNPLA2, GPAT4... Elles pourraient ainsi servir à la modification de la composition lipidique des LD et à leur renouvellement (Song et al. 2022).

1.3.2.2. Protéines de classe II et la voie CYTOLD

Les protéines de la voie CYTOLD sont d'abord traduites dans le cytosol avant de s'attacher à la surface des LD. De nombreuses protéines empruntant cette voie sont solubles et contiennent des séquences d'acides aminés qui leur permettent de former une ou plusieurs hélices amphipathiques ou des hélices hydrophobes. La combinaison d'approches informatiques et expérimentales a permis de démontrer que la surface des LD possède des défauts d'emballage des PL par la présence de TAG qui s'intercalent entre les molécules de PL.

Les larges résidus hydrophobes des hélices amphipathiques ou hydrophobes des protéines de classe II reconnaissent et interagissent avec ces défauts d’empaquetage (Figure 24) (Prévost et al. 2018). Dans le cas de protéines qui n’ont pas de structures d’hélices amphipathiques dans le cytosol, l’initiation de l’attachement de la protéine aux LD permet l’adoption de la conformation grâce aux interactions avec les groupements acyl des PL et des TAG au niveau des zones de défauts d’empaquetage, mais aussi par les interactions entre la tête hydrophile des PL et l’environnement aqueux du cytosol (Olarte et al. 2022). La présence d’un résidu tryptophane dans la séquence hydrophobe serait essentielle pour la première étape d’attachement de la protéine à la surface des LD (S. Kim, Oh, et Swanson 2021; Boeszoermyeni et al. 2015; Olarte et al. 2022).

De nombreuses protéines possédant une séquence leur permettant de se replier en hélice amphipathique sont capables de se lier à la surface des LD (Prévost et al. 2018), nécessitant un système de tri des protéines pour ne conserver que celles nécessaires aux LD. Plusieurs mécanismes seraient impliqués, dont l’accumulation de protéines à fortes interactions avec la surface du compartiment. Cela permettrait une compétition avec les protéines à ancrage plus faible (Kory et al. 2015). L’existence de modifications post-traductionnelles de protéines des LD pouvant affecter leur localisation a également été observée et pourrait constituer une autre méthode de tri (Yue et al. 2020; Olarte et al. 2022).

1.3.3. Dégradation des gouttelettes lipidiques

Les LD sont des compartiments temporaires, voués à être continuellement renouvelés selon les besoins énergétiques des cellules. Cependant, cette phase de la « vie » des LD doit être particulièrement régulée pour conserver l’homéostasie énergétique et éviter l’accumulation intracellulaire des acides gras, menant à une lipotoxicité. Deux mécanismes de dégradation des LD sont reconnus et agissent potentiellement en tandem : la lipolyse et la lipophagie. Ces deux phénomènes sont régulés par un groupe de protéines appelées Perilipins. Les acides gras produits par ces mécanismes sont ensuite mis à disposition pour l’utilisation par d’autres compartiments.

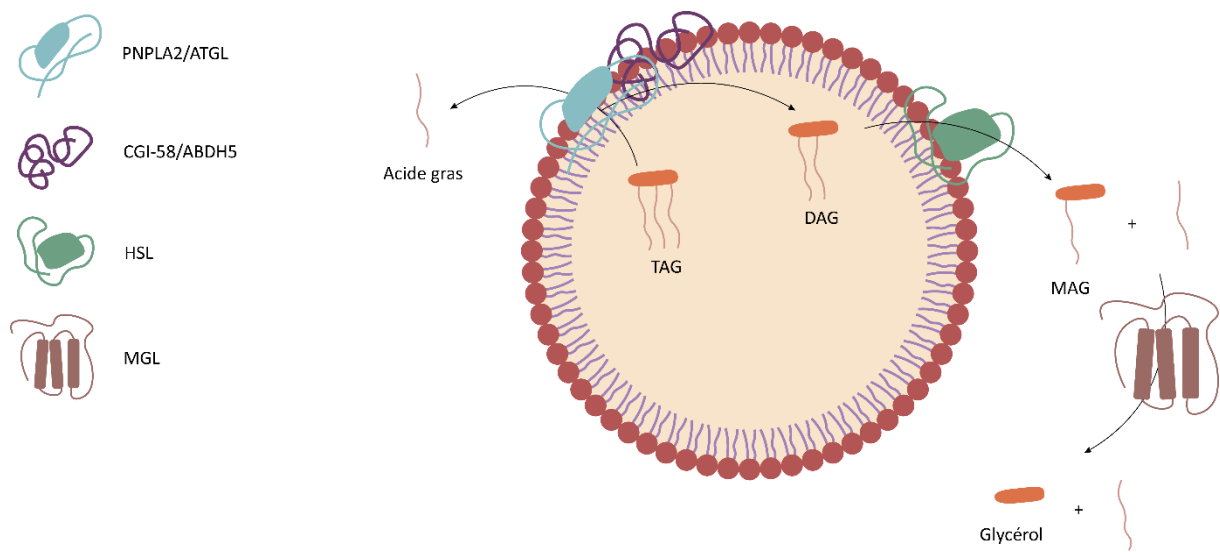


Figure 25 : la lipolyse chez l'Homme.

La lipolyse se déroule en trois étapes d'hydrolyse par des lipases : i) TAG en DAG par PNPLA2, ii) DAG en MAG par HSL et iii) MAG en glycérol par MGL. Chaque étape produit également des acides gras. Réalisé sur Illustrator.

1.3.3.1. Lipolyse

La lipolyse est un processus de dégradation des TAG permettant d'obtenir du glycérol qui entrera dans la voie de la gluconéogenèse et des acides gras qui seront mobilisés dans les tissus nécessitant de l'énergie (Cho, Patel, et Rajbhandari 2023). La première étape de la lipolyse, qui est également l'étape limitante du mécanisme, est l'hydrolyse des TAG en DAG par la PNPLA2, aussi appelée ATGL (*adipose triglyceride lipase*) (Figure 25). Bien qu'elle soit exprimée dans tous les tissus, ATGL est majoritairement retrouvée dans le tissu adipeux, où son expression est diminuée par la présence d'insuline et augmentée lors de la différenciation des adipocytes ou lors du jeûne (Lulić et Katalinić 2023). La protéine CGI-58 (*comparative gene identification*) ou ABHD5 (*α/β hydrolase domain containing 5*) est un co-activateur d'ATGL qui recrute l'enzyme à la surface des gouttelettes lipidiques et augmente son activité catalytique (Kulminskaya et Oberer 2020). ATGL hydrolyse les TAG pour former des DAG et acides gras (Eichmann et al. 2012). L'inhibition d'ATGL cause une accumulation de LD larges, tandis que la surexpression de la protéine diminue fortement leur taille (Schott et al. 2019; Smirnova et al. 2006). D'autres PNPLA, comme PNPLA1, PNPLA3, PNPLA5, PNPLA6 et PNPLA7 sont également en interaction avec les LD et CGI-58, mais leurs rôles dans la dégradation ou le renouvellement des LD ne sont pas clairement définis (Lulić et Katalinić 2023). Les DAG formés par l'action d'ATGL sont ensuite hydrolysés en monoacylglycérides (MAG) par la protéine HSL (*hormone sensitive lipase*) (Figure 25) (Giudicelli, Combes-Pastré, et Boyer 1974). HSL, qui est localisée à la surface des LD, possède un spectre de substrat très élargi et est capable d'agir sur les stérols pour former du cholestérol, mais aussi sur les TAG, bien qu'elle ne puisse pas compenser l'absence d'ATGL (Lafontan et Langin 2009). Les souris n'exprimant pas HSL accumulent fortement des DAG dans les tissus adipeux (Haemmerle et al. 2002). La dernière étape de la lipolyse est l'hydrolyse des MAG en glycérol et acide gras, catalysée par la monoglycéride lipase MGL (Figure 25). Cette protéine cytoplasmique est spécifique des MAG (Fredrikson, Tornqvist, et Belfrage 1986)

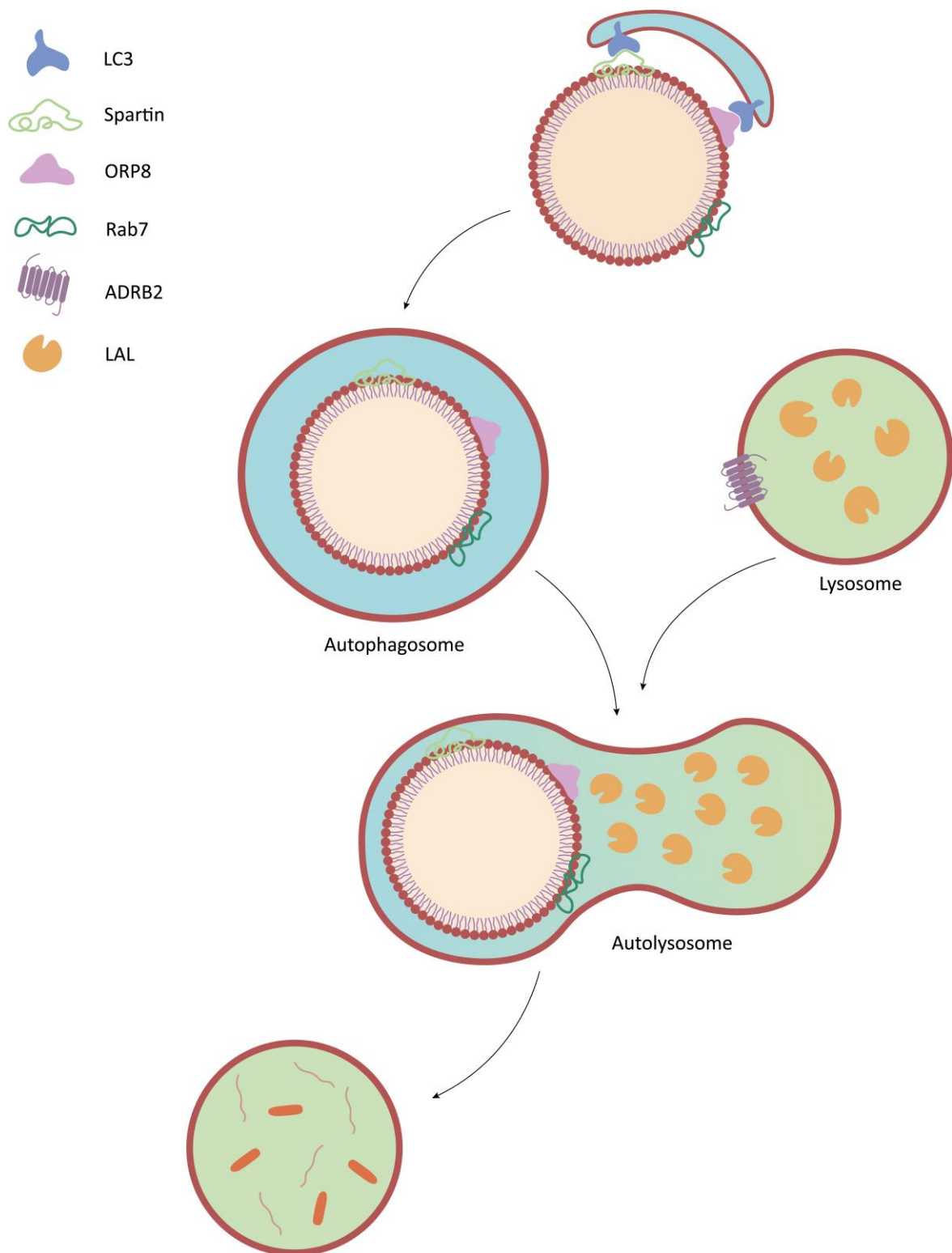


Figure 26 : Mécanisme de lipophagie chez l'Homme.

Les gouttelettes lipidiques sont phagocytées par des autophagosomes par reconnaissance de protéines à la surface des gouttelettes. Les autophagosomes contenant des gouttelettes fusionnent avec des lysosomes qui possèdent des lipases, formant des autolysosomes où les gouttelettes et leur contenu sont dégradés pour former des acides gras et du glycérol. Réalisé sur Illustrator.

1.3.3.2. Lipophagie

La lipophagie, ou autophagie sélective des LD, est un processus de dégradation des lipides dépendant des lysosomes. Lors de ce processus, des morceaux de LD ou des LD entières sont phagocytées par des structures à double membrane appelées autophagosomes, qui « séquestrent » le contenu cellulaire et fusionnent avec des lysosomes pour former des autolysosomes (Figure 26) (Zhang et al. 2022). Dans ce compartiment, le contenu des LD est hydrolysé par des lipases lysosomales acidiques (LAL, *lysosomal acid lipase*), qui ont un spectre de substrats très large (Zechner, Madeo, et Kratky 2017). L'inhibition de la machinerie de l'autophagie augmente le nombre de LD et la quantité de TAG *in vitro* dans des hépatocytes et *in vivo* dans le foie de souris (Singh et al. 2009). Plusieurs protéines des LD ont été identifiées dans la régulation de la lipophagie : les protéines Spartin et ORP8 (*oxysterol-binding protein-related protein 8*) agissent comme récepteur de la lipophagie, en liant les LD à la machinerie de l'autophagie par interaction avec les protéines LC3 (famille ATG8) (Figure 26) (Chung et al. 2023; Pu et al. 2023). Le récepteur adrénérgique endosomal ADRB2 participe à la formation des autolysosomes par interaction avec la protéine RAB7, localisée à la surface des LD (Lizaso, Tan, et Lee 2013).

Plusieurs modèles d'interactions entre la lipolyse et la lipophagie ont été proposés, mais restent à démontrer (Zechner, Madeo, et Kratky 2017). La taille des LD serait notamment un facteur dans le choix du mécanisme : les LD larges seraient d'abord ciblées par ATGL pour réduire leur taille, et la PNPLA interagirait ensuite avec les protéines ATG8 pour initier le mécanisme de lipophagie (Zhang et al. 2022).

1.3.3.3. Les perilipins : gardiennes des lipides neutres

L'intégrité et la structure des LD des mammifères sont maintenues et régulées par un groupe de protéines appelées Perilipins (PLIN). Au nombre de 5 et annotées de PLIN1 à PLIN5, ces protéines forment un manteau autour de la surface des LD pour réguler l'hydrolyse des lipides neutres par des enzymes comme les lipases. Ces protéines utilisent la voie CYTOLD, vue précédemment, pour se fixer et décorer la surface des LD.

PLIN1, ou Perilipin, est une protéine presque exclusivement exprimée dans le tissu adipeux blanc (Greenberg et al. 1991; Servetnick et al. 1995). PLIN1 réduit l'accès d'ATGL aux LD en couvrant la surface des LD et en se liant à CGI-58, empêchant l'activation de la phospholipase.

Lors de l'activation de la lipolyse, PLIN1 est phosphorylée et libère CGI-58 (Sztalryd et Brasaemle 2017; Gandotra et al. 2011). Un *knock-down* de PLIN1 favorise l'interaction entre Rab7 et les LD, indiquant que la protéine protégerait les LD de la lipophagie (Lizaso, Tan, et Lee 2013). Dans les tissus oxydatifs comme les muscles squelettiques, le cœur et le tissu adipeux brun, c'est PLIN5, ou OXPAT, qui coordonne la lipolyse (Wolins et al. 2006). PLIN5 se lie à HSL pour empêcher son activité (Wang et al. 2009), mais peut au contraire contribuer à la lipolyse en amenant CGI-58 à la surface des LD et en favorisant son interaction avec ATGL (Wang, Bell, et al. 2011). PLIN2, aussi appelée Adipophilin ou ADRP (*adipose differentiation-related protein*), est exprimée dans tous les tissus. C'est la perilipin majeure dans les tissus où PLIN1 ou PLIN5 ne sont pas exprimés. PLIN2 ne régule que modérément la lipolyse. Des études sur le rôle de la protéine donnent des rôles contradictoires dans le développement de maladies hépatiques (Sztalryd et Brasaemle 2017). Elle joue également un rôle dans la régulation de la lipophagie (Tsai et al. 2017; Robichaud et al. 2021). Enfin, les rôles de PLIN3 (TIP47) et PLIN4 (S3-12) sont peu connus. PLIN3 possède potentiellement un rôle dans le développement de maladies hépatiques (Carr et al. 2012). La protéine est exprimée dans tous les tissus et est, tout comme PLIN2, impliquée dans la régulation de la lipophagie (Robichaud et al. 2021). PLIN4, qui est associé aux LD émergentes dans les adipocytes, n'a pas de rôle déterminé (Wolins et al. 2003).

1.3.4. Interactions avec les autres compartiments : la communauté des lipides

Après leur formation, les LD interagissent constamment avec d'autres compartiments pour permettre des échanges de lipides par l'intermédiaire de sites de contact membranaires (SCM), zones où des membranes se retrouvent à moins de 30 nm de distance (Jain et Holthuis 2017). En plus du RE, les LD sont en contacts étroits avec la mitochondrie et les péroxysomes, permettant les échanges de lipides sans passer par le cytosol, limitant ainsi le risque de lipotoxicité.

1.3.4.1. Mitochondries

Les acides gras produits lors de la lipolyse ou lipophagie sont utilisables pour la production d'énergie *via* l'oxydation des acides gras pour générer de l'acétyl-CoA, qui entre ensuite dans le cycle de Krebs. Ces réactions ont lieu dans les mitochondries, nécessitant un transfert des acides gras des LD vers la mitochondrie et donc des sites de contacts entre les deux organites.

Dans les cardiomyocytes et cellules rénales, la protéine PLIN5 ancre les mitochondries à la membrane des LD et stimule l'oxydation mitochondriale (Wang, Sreenivasan, et al. 2011; Kimmel et Sztalryd 2014; Kien et al. 2022). Dans les adipocytes, plusieurs protéines sont potentiellement impliquées dans le contact entre les deux compartiments. PLIN1 interagit notamment avec les protéines mitochondriales MFN2 (*mitofusin 2*) et Opa1 (*optic atrophy 1*), qui sont impliquées dans les événements de fusion des mitochondries (Pidoux et al. 2011; Boutant et al. 2017). Opa1 est notamment retrouvée à la surface des LD dans les adipocytes en différenciation et participe à la régulation de la lipolyse par la phosphorylation de PLIN1 (Pidoux et al. 2011).

Le contact entre les LD, les mitochondries et le RE dans les adipocytes est également régulé par la protéine mitochondriale MIGA2 (mitoguardin-2). La protéine possède une poche hydrophobe qui permettrait le transport de phospholipides et d'acides gras entre les membranes (Freyre et al. 2019; H. Kim et al. 2022; Hong et al. 2022). Les contacts LD-mitochondries sont également observés dans des organes où PLIN1 et PLIN5 ne sont pas exprimés, suggérant l'implication d'autres protéines dans la régulation des interactions entre les organites (Olzmann et Carvalho 2019).

1.3.4.2. Péroxysomes

Les péroxysomes représentent chez les levures bourgeonnantes comme *S. cerevisiae* le site unique de β -oxydation, et ce sont en général des compartiments importants dans le métabolisme lipidique, nécessitant des contacts étroits avec les LD pour le transfert de lipides. Chez l'Homme, bien que la mitochondrie soit le lieu principal de β -oxydation, les péroxysomes permettent l'oxydation des acides gras à très longues chaînes. De plus, on observe chez les souris ne possédant pas de péroxysomes une accumulation de larges LD hépatocytaires (Dirkx et al. 2005). Comme les LD, les péroxysomes dérivent de la membrane du RE et naissent à partir de sous-domaines du RE partagés ; les deux compartiments pourraient interagir dès les premières étapes de leur formation (Joshi et al. 2018). Dans un modèle de *S. cerevisiae* cultivé en présence d'acide oléique pour seule source de carbone, les péroxysomes adhèrent aux LD et peuvent même pénétrer à l'intérieur des LD *via* une extension appelée *pexopodia*, associée à une fusion de la monocouche des LD au feuillet externe de la membrane péroxysomale (Binns et al. 2006).

Chez les mammifères, la β -oxydation péroxysonale participe à la régulation de la lipolyse ; la protéine péroxysonale PEX2 contrôle les niveaux d'ATGL en induisant une poly-ubiquitination de cette protéine, favorisant sa dégradation (Ding et al. 2021). Une protéine permettant l'interaction entre les deux compartiments a également été identifiée chez les mammifères : l'ATPase M1 Spastin s'insère dans la monocouche des LD et forme un complexe avec la protéine péroxysonale ABCD1 (*ATP binding cassette subfamily D member 1*) pour créer un pont entre les deux compartiments et faciliter le transport d'acides gras en recrutant les protéines IST1 (*increased sodium tolerance 1*) et CHMP1B (*charged multivesicular body protein 1B*). Ces protéines font partie du complexe ESCRT-III (*endosomal sorting complex required for transport III*), qui est impliqué dans le remodelage des membranes et l'autophagie. La délétion de M1 Spastin diminue significativement les contacts entre les deux compartiments (Chang et al. 2019).

1.3.5. Les gouttelettes lipidiques chez les parasites protozoaires

Comme tout autre organisme, les protozoaires utilisent les LD comme réserve d'énergie pour leur métabolisme et le renouvellement de leurs membranes. Cependant, leurs fonctions et places dans le métabolisme des parasites restent très peu connues, tout comme les enzymes impliquées. Les quelques protéines caractérisées chez les protozoaires montrent pourtant un rôle critique des LD dans la virulence des parasites.

1.3.5.1. *Plasmodium* sp.

Lors du stade érythrocytaire, *Plasmodium falciparum* utilise l'hémoglobine pour sa propre croissance. Cette utilisation a pour conséquence la production d'hème, une molécule toxique pour le parasite. La détoxification de l'hème se fait par sa conversion en pigment insoluble appelé hémozoïne, qui est ensuite stocké dans la vacuole alimentaire du parasite. Les LD de *P. falciparum* sont fortement associées à cette vacuole ; les lipides contenus dans les LD sont impliqués dans la détoxification de l'hème et la taille des LD influence cette production dans un modèle d'hémozoïne synthétique (Jackson et al. 2004; Ambele et al. 2013; Pandey et al. 2003). Par ailleurs, la LysoPLA PfLPL1 est localisée au niveau des LD et produit des lipides nécessaires pour la conversion de l'hème de l'hémozoïne (Asad et al. 2021). PfdGAT, protéine du RE homologue des DGAT mammifères, est responsable de la production de TAG chez le parasite. Cette production est bien plus importante dans les stades érythrocytaires que dans le reste du cycle évolutif du parasite (Vielemeyer et al. 2004).

On observe d'ailleurs une forte accumulation de TAG dans les globules rouges infectés par *P. falciparum*, pourtant à des niveaux indétectables dans les GR non-infectés (Vielemeyer et al. 2004; Jackson et al. 2004). Lors du stade hépatocytaire, l'infection par les parasites *Plasmodium berghei* cause une forte augmentation du nombre de LD dans les hépatocytes (Rodríguez-Acosta et al. 1998; Pulido-Méndez et al. 2006). Enfin, les gouttelettes lipidiques représentent un compartiment très dynamique tout au long du cycle évolutif de *P. falciparum* ; aux stades érythrocytaires, le nombre de LD augmente lors de la maturation intracellulaire des parasites (Lee et al. 2024). Les TAG présents dans les gouttelettes sont ensuite mobilisés et hydrolysés en glycérol et acides gras lors de la différenciation du stade schizonte vers le stade mérozoite ; l'inhibition de la lipolyse inhibe la différenciation en mérozoite et la sortie active des GR (Lee et al. 2024).

1.3.5.2. *Toxoplasma gondii*

L'orthologue de PfDGAT chez *T. gondii*, TgDGAT1, également résidente du RE, possède un rôle similaire à la protéine de *P. falciparum* : lorsque le gène est inséré dans un mutant de *S. cerevisiae* ne produisant pas de lipides neutres, la synthèse de TAG réapparaît dans la levure, associée à la production de LD (Quittnat et al. 2004). L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de DGAT1 contre *T. gondii* à des concentrations non-toxiques pour les cellules hôtes induit des anomalies dans les structures membranaires des parasites (Nolan et al. 2018). De plus, *T. gondii*, qui est incapable de synthétiser du cholestérol *de novo* pour la synthèse de TAG, détourne ce lipide à partir des LDL de son hôte et doit donc pouvoir les transformer et stocker pour son propre usage (Nolan et al. 2018).

Le parasite possède des protéines orthologues aux protéines mammifères ACAT : deux isoformes de TgACAT1 appelées TgACAT1 α et TgACAT1 β , et la protéine TgACAT2. Ces protéines du RE participent à la synthèse d'esters de cholestérol. Les niveaux d'expression de TgACAT1 α sont régulés par la présence d'acides gras libres et participent à la biogenèse des LD (Nishikawa et al. 2005; Lige, Sampels, et Coppens 2013). La délétion de TgACAT1 ou TgACAT2 impacte la croissance des parasites et la double délétion n'est pas viable (Lige, Sampels, et Coppens 2013).

Toxoplasma est également capable d'exploiter les LD de son hôte : lors de l'infection, la vacuole parasitophore renfermant les parasites en multiplication dans la cellule est entourée de nombreuses LD de la cellule hôte.

Le parasite est capable d'internaliser les LD de l'hôte dans sa propre vacuole pour y récupérer les lipides et les incorporer dans ses propres membranes. La PLA₂ TgLCAT participe à ce processus d'acquisition des lipides (Charron et Sibley 2002; Pzenny et al. 2016; Nolan, Romano, et Coppens et al. 2017). En réponse à cette internalisation, les cellules hôtes produisent des molécules impliquées dans la réponse inflammatoire comme l'interleukine-12 (IL-12), interféron- γ (IFN- γ) et PGE₂ (Gomes et al. 2014). *T. gondii* possède une lipin (TgLipin) qui contrôle, tout comme chez l'Homme, la synthèse de DAG et les niveaux d'acide phosphatidique de la cellule, participant au contrôle de la lipotoxicité du parasite. La protéine est localisée à l'interface RE-LD et est essentielle à la survie du parasite ; la délétion de son expression induit des anomalies membranaires, causant des défauts lors de la division cellulaire, puis la mort des parasites due à l'accumulation d'acides gras et d'acide phosphatidique à des niveaux lipotoxiques (Dass et al. 2021).

1.3.5.3. *Leishmania* sp.

L'infection de macrophages par *Leishmania major* cause une accumulation de lipides neutres dans les macrophages, associée à une augmentation du nombre de LD à proximité des vacuoles parasitophores où les parasites sous forme promastigotes se répliquent (Rabhi et al. 2012). Ces LD sont formés indépendamment de la présence de parasites dans les macrophages, mais sont plutôt induits par des voies de signalisation impliquant des signaux paracrine après reconnaissance de molécules parasitaires, en association avec l'activation de la transcription de gènes tels que DGAT2 et cPLA₂ α (Rabhi et al. 2016). Cette induction de la formation des LD n'apparaît pas chez toutes les espèces de *Leishmania* ni tous les types cellulaires, puisque *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania infantum chagasi* n'induisent pas la formation de LD dans les cellules dendritiques ou macrophages, respectivement (Lecoeur et al. 2013; Araújo-Santos et al. 2014). Chez *L. i. chagasi*, les LD sont le site de production de la prostaglandine F_{2 α} (PGF_{2 α}) par l'enzyme PGFS (*prostaglandin F_{2 α} synthase*), localisée dans les LD de *L. i. chagasi* sous forme métacyclique. L'incubation des parasites avec de l'acide arachidonique augmente la formation de LD et la libération de PGF_{2 α} par les parasites (Araújo-Santos et al. 2014). De plus, on retrouve un nombre plus élevé de LD dans les formes infectieuses de *L. i. chagasi* et lors de la différenciation de la forme épimastigote non-infectieuse vers la forme infectieuse métacyclique (Araújo-Santos et al. 2014).

La production d'écossanoïdes suite à l'induction des LD par l'acide arachidonique est observée chez différentes espèces de *Leishmania* causant différentes formes cliniques de leishmaniose (*L. amazonensis*, *L. braziliensis* et *L. infantum*), mais des différences sont observées lors de l'induction par des PUFA. En effet, *L. amazonensis* est incapable de répondre à la stimulation par ces molécules, suggérant des différences au niveau du génome et des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique et la formation des LD (Andrade et al. 2023). Les enzymes responsables restent cependant à être identifiées.

Enfin, l'activation du mécanisme de mort cellulaire ou l'utilisation de drogues antiparasitaires interférant avec l'activité mitochondriale et causant du stress oxydatif ont pour conséquence, entre autres, la production de LD par *Leishmania* (Mendes et al. 2016; da Silva Rodrigues et al. 2019; de Macedo-Silva et al. 2011).

1.3.5.4. *Trypanosoma cruzi*

Les formes infectieuses trypomastigotes de *T. cruzi* peuvent incorporer de l'acide arachidonique pour les stocker dans les LD et comme *Leishmania*, le parasite utilise les LD comme site de synthèse des prostaglandines ; l'accumulation des LD chez *T. cruzi* est d'ailleurs concomitante avec la synthèse de prostaglandine E₂. Les gouttelettes lipidiques de *T. cruzi* représente donc un éventuel mécanisme d'échappement du pathogène face à la réponse immunitaire de l'hôte (Toledo et al. 2016; de Almeida et al. 2018). L'utilisation d'inhibiteurs dirigés contre des enzymes de synthèse des acides gras ou des drogues anti-inflammatoires inhibent l'émergence des LD de *T. cruzi*, en association avec une diminution de la production d'écossanoïdes et de la croissance parasitaire (de Almeida et al. 2018).

Chez les parasites sous forme insecte épimastigote, les LD sont fortement associées au RE, à la mitochondrie et aux glycosomes. Le cholestérol endocyté par les parasites est estérifié en cholesteryl ester, lipide neutre majoritaire des LD des épimastigotes (Pereira et al. 2018).

1.3.5.5. *Trypanosoma brucei*

À la différence des autres parasites protozoaires détaillés ci-dessus, les trypanosomes africains sont des parasites extracellulaires. L'utilisation des ressources de l'hôte, dont les lipides, dépend donc de systèmes différents de ceux employés par les parasites intracellulaires et les données sur *T. cruzi* ou *Leishmania* sp. ne sont pas extrapolables aux parasites Salivaria.

Chez *T. brucei*, la formation de LD peut être induite par la présence d'oléate dans le milieu de culture, associé à une augmentation de la concentration en TAG (Allmann et al. 2014). La seule protéine impliquée dans la synthèse des TAG caractérisée chez le parasite est TbLpn (Lipin, Tb927.7.5450), homologue des lipins chez les mammifères ou de Pah1p de *S. cerevisiae*. TbLpn est cytosolique et possède une activité phosphatidate phosphatase. TbLpn est essentielle chez la forme procyclique de *T. brucei* ; une diminution de l'expression de l'enzyme par ARNi provoque un ralentissement de la croissance des parasites puis un arrêt total au bout de 8 jours de culture. On observe également dans ces conditions une diminution du nombre de LD observées après coloration au Nile Red, associé à une diminution des niveaux de TAG et de leur formation. Cette observation se fait en absence ou présence d'oléate. L'ajout d'oléate dans la souche TbLpn ARNi induite cause un arrêt de croissance plus rapide qu'en l'absence de l'acide gras, ce qui conforte l'hypothèse d'une possible lipotoxicité induite par la présence d'acides gras en trop grande quantité dans la cellule sans la disponibilité d'un compartiment de stockage, comme observé chez *T. gondii* (Dawoody Nejad et al. 2018; Dass et al. 2021).

La seconde protéine impliquée dans les LD chez *T. brucei* est TbLDK (*lipid droplet kinase*, Tb927.11.8940), protéine kinase localisée à la surface des LD du parasite. La protéine possède un domaine hydrophobe qui permet sa localisation à la périphérie de l'organite ; une version mutante de la protéine sans le domaine hydrophobe chez la forme procyclique est retrouvée diffuse dans le cytosol. Le *knock-down* de TbLDK engendre une forte diminution du nombre de LD dans les formes procycliques et sanguines. Contrairement à TbLpn, cette protéine n'est pas essentielle et l'induction d'un ARNi ciblant TbLDK provoque uniquement un léger ralentissement de la croissance chez les formes sanguines. Les auteurs émettent l'hypothèse que les besoins élevés en acide myristique des parasites sous forme sanguine pour la production de l'ancre GPI ou leur système de transport endocytique et exocytique pourraient être impactés par la diminution des acides gras fournis par les LD. Cependant, aucun mutant *knock-out* du gène codant pour TbLDK n'a été réalisé. TbLDK est à ce jour la seule protéine caractérisée ayant une localisation à la surface des LD chez *T. brucei* (Flaspohler et al. 2010).

Dans l'insecte, où les parasites se déplacent constamment pour évoluer, la motilité des parasites pourrait être favorisée par la présence d'une source d'énergie constante, apportée par les lipides contenus dans les LD (Allmann et al. 2014).

Projet de recherche

Les gouttelettes lipidiques sont un organite essentiel dans la régulation et distribution des lipides dans les cellules, et représentent un intérêt grandissant en recherche par la découverte de nouveaux rôles et interactions avec les autres compartiments cellulaires. Chez les organismes pathogènes comme les parasites protozoaires, les études montrent que les gouttelettes lipidiques auraient potentiellement un rôle crucial dans leur survie et adaptation dans l'hôte. Les rôles des gouttelettes lipidiques chez *Trypanosoma brucei* et les protéines qui sont associées à ce compartiment sont aujourd'hui très peu connus.

Cette thèse avait ainsi pour objectif d'identifier et caractériser de nouvelles protéines impliquées dans la biologie des gouttelettes lipidiques chez *T. brucei*. Nous avons identifié *in silico* une nouvelle phospholipase potentiellement localisée à la surface des gouttelettes lipidiques, que nous avons nommé TbPat (Tb927.4.1780). Cette phospholipase fait partie du groupe des *patatin-like*, protéines associées à la virulence chez d'autres parasites tels que *Plasmodium* et *Toxoplasma*. Après avoir confirmé la localisation de cette protéine à la surface des gouttelettes lipidiques, les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de montrer l'effet de la modification de l'expression de TbPat (surexpression, délétion) sur les gouttelettes lipidiques, mais également sur la survie des parasites, leur lipidome, métabolisme et protéome et ce tout au long de leur cycle évolutif.

Cette étude représente une première étape vers la caractérisation des protéines associées à la biologie des gouttelettes lipidiques des trypanosomes africains et la compréhension des rôles de ces organites chez ces parasites, mais également chez des organismes eucaryotes plus complexes.

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Lignées cellulaires

2.1.1.1. Trypanosomes

Plusieurs espèces et formes de trypanosomes ont été utilisées au cours de cette thèse. Les parasites sont tous cultivés sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) de niveau 2.

Les lignées de *T. brucei brucei* cultivées expriment constitutivement le répresseur de la tétracycline (TetR) et l'ARN polymérase du phage T7 (ARNpT7) après insertion des plasmides pLew29 (forme procyclique)/pLew90 (forme sanguine) et pLew13. Les plasmides contiennent un gène de résistance à l'hygromycine et la néomycine, respectivement. Ces lignées peuvent ainsi exprimer de manière inductible des gènes ectopiques dépendamment de l'ajout de tétracycline dans le milieu de culture. La lignée EATRO1125T7T a été utilisée pour la forme procyclique, tandis que la lignée AnTat 1.1 90:13 a été utilisée pour la forme sanguine. La souche AnTat est dite pléomorphe, c'est-à-dire qu'elle est capable de se différencier naturellement de la forme *slender* à la forme *stumpy*.

2.1.1.2. Bactéries

Les transformations et l'amplification des plasmides purifiés se font avec les bactéries compétentes *Escherichia coli* XL1-Blue. Ces bactéries sont déficientes pour l'endonucléase A (endA) et la recombinaison (recA). Ces déficientes permettent respectivement une amélioration de la qualité de l'ADN lors de l'extraction du plasmide et une meilleure stabilité de l'insert pendant le clonage.

2.1.2. Milieux de culture

2.1.2.1. *T. brucei brucei* forme procyclique

T. brucei brucei EATRO1125T7T est cultivée dans le milieu SDM79 (Semi-Defined Medium, GE Healthcare G3344.3005), qui contient 2,184 g/L NaHCO₃, 1,802 g/L D-glucose (Sigma G-7021), 511 mg/L L-glutamine, 0,610 g/L L-proline (Sigma P-5607), 0,405 g/L de L-thréonine (Sigma T-8441), 0,10 g/L pyruvate de sodium (Sigma P-3662), 50 mg/L D-glucosamine (Sigma G-1514), 22 mg/L acide glutamique (Sigma G-8415), 10,2 mg/L acétate de sodium (Sigma S-5636), 10% (v/v) sérum de veau fœtal (SVF) (Corning 15377636) décomplémenté et 5 µg/mL hémine (Sigma H-9039).

	<i>T. brucei</i> PCF	<i>T. brucei</i> BSF	<i>T. congolense</i> BSF
Hygromycine	25 µg/mL	5 µg/mL	/
Néomycine	10 µg/mL	2,5 µg/mL	/
Phléomycine	5 µg/mL	2,5 µg/mL	Concentration croissante de 0,5 µg/mL à 2 µg/mL

Tableau 3 : Antibiotiques.

Plusieurs antibiotiques sont également introduits dans le milieu : 20000 U pénicilline et 20 mg streptomycine (Sigma P-4333), ainsi que de l'hygromycine et néomycine (Tableau 3). Les formes procycliques de *T. brucei brucei* sont maintenues en culture à 27°C, température interne de la mouche tsétsé, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

2.1.2.2. *T. brucei brucei* forme sanguine

La forme sanguine de *T. b. brucei* AnTat est cultivée dans le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco 42200030), qui contient 3,024 g/L NaHCO₃ (Euromedex 6885-1), 0,136 g/L hypoxanthine (Sigma H-9636), 0,110 g/L de pyruvate de sodium, 39 mg/L thymidine (Sigma T-9250), 28 mg/L acide bathocuproïne disulfonique (Sigma B-1125), 10% (v/v) SVF décomplémenté, 0,2 mM β-mercaptoéthanol (Sigma M-6250), 1,5 mM L-cystéine (Sigma C-1276), 20000 U de pénicilline et 20 mg de streptomycine, ainsi que des antibiotiques utilisés pour la sélection des trypanosomes (Tableau 3). Les parasites sont maintenus dans un milieu à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

2.1.2.3. *T. congolense*

La forme sanguine de *T. congolense* IL3000 est cultivée dans un milieu MEM (Minimum Essential Media) dit modifié, composé de 9,6 g/L de MEM (Sigma M-0643), 5,96 g/L de HEPES acide (Euromedex 10-110-C), 2,2 g de NaHCO₃, 1 g de D-glucose, 0,110 g de pyruvate de sodium, 10,68 mg d'adénosine (Sigma A-4036), 14 mg hypoxanthine, 4 mg thymidine et 14,1 mg acide bathocuproïne disulfonique, pH = 7,2 à 7,4. Le milieu est complété par 20% (v/v) sérum de chèvre (InvitroGen 16210072), 200 µM β-mercaptoéthanol et 2 mM L-glutamine (Sigma G-8540). Pour la sélection de mutants, de la phléomycine est ajoutée au milieu (Tableau 3). Les parasites sont maintenus en culture à 34°C dans une atmosphère à 5% de CO₂.

2.1.2.4. *E. coli*

Les bactéries XL1-Blue sont cultivées à 37°C en milieu LB (Lysogeny Broth) qui est constitué de 10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L extrait de levure et 10 g/L NaCl ainsi que de l'ampicilline à 100 µg/mL pour la sélection des bactéries transformées. Elles peuvent être cultivées sur LB Agar (milieu gélosé) sur boîte de Pétri ou en milieu LB liquide, à 37°C. En milieu liquide, les cultures sont maintenues en agitation à 250 rpm.

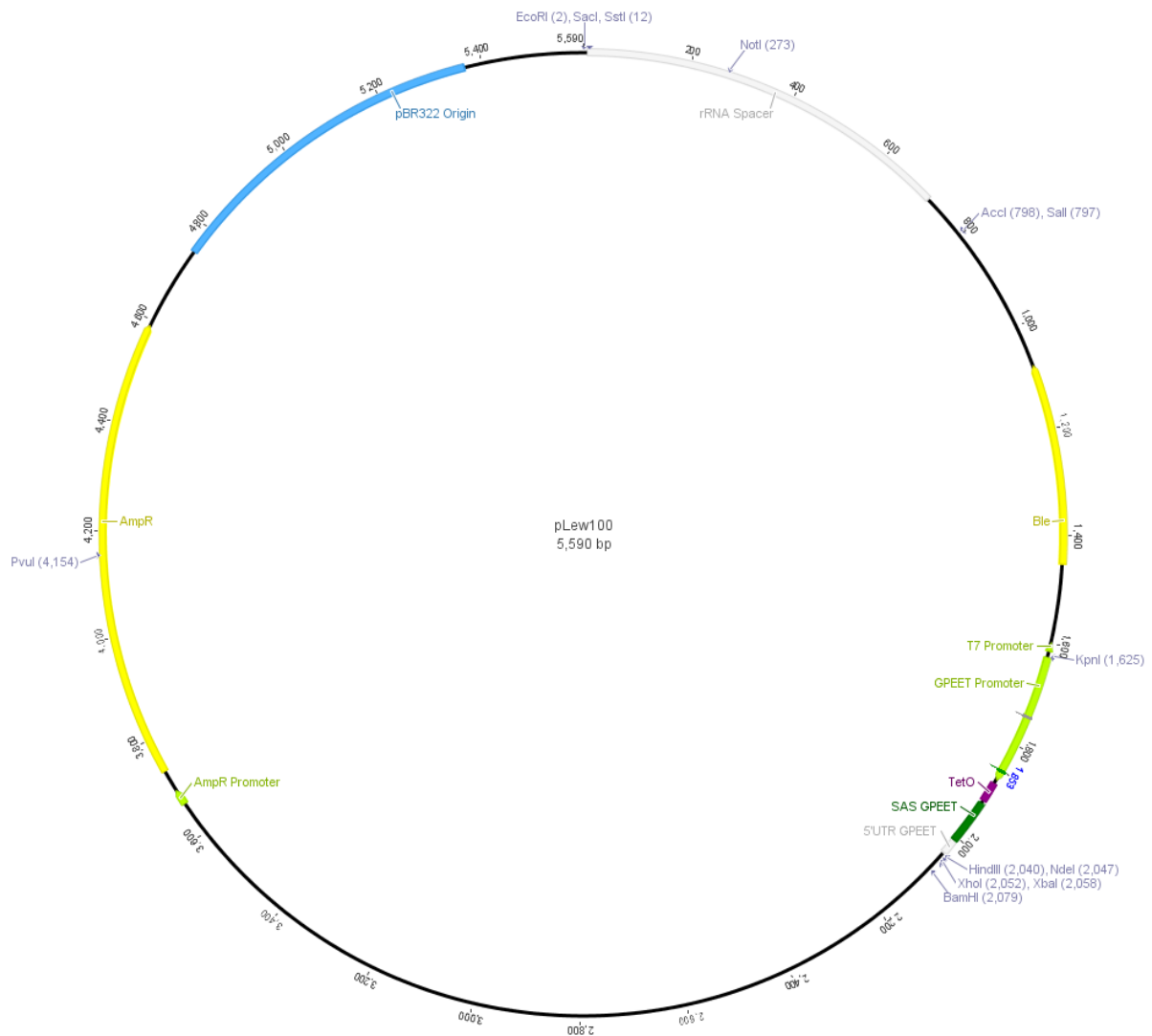


Figure 27 : Schéma du plasmide pLew100.

Fait avec Geneious v7.0.6.

2.1.3. Milieux de congélation

Les milieux de congélation sont spécifiques au milieu de culture utilisé pour chaque espèce/forme parasitaire cultivée :

- *T. b. brucei* forme procyclique : les parasites sont congelés dans un milieu SDM79 complet contenant 10% (v/v) de glycérol 100% et 20 % (v/v) de sérum de veau fœtal.
- *T. b. brucei* forme sanguine : les parasites sont congelés dans un milieu IMDM complet auquel est ajouté 7% de glycérol 100%.
- *T. congolense* : les parasites sont congelés dans un milieu MEM modifié complet contenant 35% de sérum de chèvre et 15% de glycérol 30%.

2.1.4. Vecteur d'expression : pLew100

Le vecteur pLew100 permet l'expression conditionnelle ou constitutive de gènes d'intérêt dans les trypanosomes sous formes procycliques et sanguines (Wirtz et al. 1999). Ce plasmide possède une origine de réplication permettant son maintien dans un système bactérien, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection du plasmide dans les bactéries l'ayant intégré. L'intégration de pLew100 dans *T. brucei* se fait par recombinaison homologue au niveau de régions *rDNA spacer* par linéarisation du vecteur au niveau du site de restriction Not1 (Figure 27). Le plasmide contient un gène de résistance à la phléomycine (Ble) sous contrôle du promoteur T7 pour la sélection de l'intégration par les parasites. L'expression inductible des gènes est permise par la présence dans la séquence de pLew100 de l'opérateur à la tétracycline TetO.

Nom de l'amorce (sens, F ou anti-sens, R)	Séquence 5' – 3' (site de restriction)	Utilisation
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>		
PH_35 (F)	(5'UTR) CTTTGGTGATGCATAAGCTGA	Séquençage de TbPat
PH_2 (R)	GATATATGATGTTCTCTATGC (3'UTR)	
TbPATGFP5p (F)	AGCATATGATGCATAAGCTGACTCAGCTTCTG	Amplification de TbPat Δ HD pour insertion dans pLew100GFP-X (BamHI/EcoRI)
PH_5 (R)	GCTCTAGATTACAGAAGAGGTCGACC	
PH_80 (F)	GTGCAGGGGAGCGATCAGCACCTCGAGAGGACCTCG TGATTTTTTCGCGTATTTAGGCCATAGTTTTATCTAG AGAGGTACACACAAAC	Amplification de 10TY pour transfection dans la séquence codante de TbPat. Cf ARNg associé dans le Tableau 5.
PH_81 (R)	GGTCTGAAGACCCGGAATATGCGGATCCTCAATCAAG AGGATCTTGGTTCGT	
KO-TbPat_FW (F)	GGGTTGCTGGAGAAGCTGGCTGCAGAGGGGAAACG TGTTAGTTTAGATGAATAAGTTAACTAGATAAATGA CTGTGGAT	Cassette STOP pour insertion dans la séquence codante de TbPat. Cf ARNg associé dans le Tableau 5.
KO-TbPat_RV (R)	CGAGCATCGTTGCCGCTAGCGATCCGGCACTGCATCC ACAGTCATTATCTAGTTAACTTATTCATCTAAACCTA ACACG	
PATMD5p (F)	CTGTGGATGCGCTGCCGGATCGC	Mutagenèse dirigée sur la serine 68 de TbPat
PATMD3p (R)	CGCATCCGGCAGCGCATCCACAG	
<i>Trypanosoma congolense</i>		
ET296 (F)	TCGTTCCCGCCTTCTCCGGGCTGCTGGCGCCCTATTGG GACCCCTCGGCTAGCCCGTACCGGGGGCACAGCAAG G	Cassette BleR pour insertion dans TcGK. Cf ARNg associé dans le Tableau 5.
ET297 (R)	ATGATATGTGCGCGTGTCTTAAGCGTCATCCCGA CGATGGTCCCACGCTGCAAGGCCTTGCAGAATACTG C	
ET298 (F)	AATGGTGGCATGACGATGAATTCGTGGTACGACATA AGGGACGGGACCTTAGCCCGTACCGGGGGCACAGCA AGG	Cassette BleR pour insertion dans TcLysoPLA. Cf ARNg associé dans le Tableau 5.
ET299 (R)	GGTAGTTCGCTGACTTCATAATGGTTTCGTTGTCCTCA CGTTTCCCTCACCTGCAAGGCCTTGCAGAATACTGC	

Tableau 4 : Amorces.

BleR, gene de résistance à la phléomycine; TbPat, *T. brucei* patatin-like phospholipase (Tb927.4.1780); TcGK, *T. congolense* glycerol kinase (TcIL3000_0_55170); TcLysoPLA, *T. congolense* lysophospholipase (TcIL3000.A.H_000623300); ARNg, guide ARN.

2.2. Méthodes

2.2.1. Biologie moléculaire

2.2.1.1. Extraction d'ADN génomique

L'ADN génomique (ADNg) des parasites est extrait grâce à deux kits d'extraction d'ADN différents :

Kit NucleoSpin® Blood (Macherey-Nagel, 740951). Une culture d'environ 1.10^7 parasites est centrifugée à 400 g pendant 10 minutes puis reprise dans 200 µL de PBS. La suite du protocole se fait en suivant les indications dans la notice d'utilisation du kit. L'ADNg obtenu est dosé et conservé à 4°C.

- Kit prepGEM® Bacteria (MicroGEM, PBA0500). Une culture de 50 µL de *T. brucei* forme procyclique ou 500 µL de *T. brucei* forme sanguine ou *T. congolense* est centrifugée à 3000 g pendant 3 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans un mélange de 25 µL contenant pour un tube 0,5 µL de prepGEM, 2,5 µL de *enhancer*, 2,5 µL de tampon et 19,5 µL d'eau. Les solutions passent ensuite dans un thermocycleur pour une étape à 75°C pendant 10 minutes puis 95°C pendant 5 minutes. L'ADNg obtenu est conservé à 4°C.

2.2.1.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR est réalisée pour l'amplification de régions d'ADN d'intérêt, à partir d'une matrice qui est soit de l'ADNg, soit un plasmide. 10 à 50 ng de matrice est mélangé à 0,5 µM d'amorce sens et 0,5 µM d'amorce antisens (Tableau 4) pour l'amplification de la séquence d'intérêt et un mix réactionnel dont les composants (polymérase, dNTPs, MgCl₂, KCl, stabilisateurs et tampon de charge) sont inclus dans le prémix 2X Taq'Ozyme OneMix® w/Dye (Ozyme, OZYA011). La PCR est réalisée dans un thermocycleur. Une première étape de dénaturation à 95°C pendant 2 minutes est suivie d'un cycle de 30 répétitions en 3 phases : une dénaturation à 95°C pendant 10 secondes, une hybridation à 50-70°C (spécifique au couple d'amorces) pendant 30 secondes puis une élongation à 72°C pendant 30 secondes à 2 minutes (selon la taille de la séquence à amplifier). Après une dernière amplification à 72°C pendant 4 minutes, le produit PCR peut être analysé ou purifié immédiatement ou conservé à 4°C.

2.2.1.3. Electrophorèse sur gel d'agarose

Le gel d'agarose permet la séparation de l'ADN en fonction de sa taille. Il est notamment utilisé pour révéler les produits de l'amplification par PCR. Une solution d'agarose à 1% ou 1,5% est préparée en amont par la solubilisation de 1 g ou 1,5 g d'agarose (Eurobio BIO-41025) dans 100 mL de tampon TBE 0,5X (Tris borate EDTA, Euromedex). La solution est portée à ébullition avant d'être coulée sur une cuve support. Une goutte de BET (bromure d'éthidium), agent intercalant permettant de révéler la présence d'ADN sous UV, est ajoutée à la solution. Les échantillons sont déposés sur le gel et migrent dans une cuve contenant du TBE 0,5X à une tension de 170 V pendant 30 minutes. La présence de fragments d'ADN et leur taille sont vérifiés avec le Gel Doc™ EZ System.

2.2.1.4. Purification des produits PCR

Les produits PCR en solution ou dans le gel d'agarose sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, 740609). Le protocole est réalisé selon la notice d'utilisation fournie par le fabricant.

2.2.1.5. Clonage et transformation de bactéries compétentes

Les différentes étapes de clonage et de transformation permettent l'insertion d'une séquence d'intérêt (insert) dans un plasmide (vecteur) qui contient un gène de résistance à un antibiotique bactérien, le plus souvent ici l'ampicilline. La séquence doit d'abord être amplifiée par PCR avec des amorces apportant aux extrémités de l'insert des sites de restriction présents dans le vecteur. Le produit PCR et le plasmide sont ensuite digérés par des enzymes de restriction reconnaissant spécifiquement les sites choisis (Anza, en suivant la notice d'utilisation du fabricant). La digestion est suivie d'une ligation de l'insert et du vecteur, à un ratio insert:vecteur de 3:1. La ligation se fait à l'aide du Quick Ligation™ Kit (New England Biolabs, M2200) ou de la T4 DNA Ligase (Promega, M1801). La transformation dans les cellules compétentes *E. coli* XL1-Blue se fait par choc thermique. Le produit de ligation (20 µL) est entièrement mélangé à la solution contenant les bactéries (100 µL). Le mélange est placé à 4°C pendant 30 minutes puis un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secondes. Après un nouveau passage à 4°C pendant 5 minutes, 300 µL de LB préalablement chauffé à 37°C est ajouté. Le produit de transformation est placé 30 minutes à 37°C dans un incubateur avec agitation (250 rpm) puis la solution est étalée sur boîte LB-ampicilline. La boîte est placée à 37°C pour une incubation sur la nuit.

Les colonies sont ensuite repiquées dans 4 mL de milieu LB-ampicilline liquide et incubent une nuit à 37°C sous agitation. Les plasmides peuvent alors être extraits. Cette technique permet également l'amplification de plasmides en routine.

2.2.1.6. Extraction d'ADN plasmidique

Deux méthodes de purification ont été utilisées pendant la thèse, selon l'utilisation ultérieure du plasmide :

- Recherche de plasmides ayant intégré une cassette : 1 mL de culture est centrifugé à 11 000 g pendant 2 minutes. Le culot est resuspendu dans 300 µL de tampon STET (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH = 8, 1 mM EDTA pH = 8 et 5% Triton X-100) et 25 µL de lysozyme à 10 mg/mL dissous dans 10 mM Tris-HCl pH = 8. Les solutions sont placées sur glace pendant 5 minutes avant incubation à 100°C au bain-marie sec et un nouveau passage sur glace pendant 1 minute. Les solutions sont centrifugées pendant 10 minutes et les culots sont enlevés. 400 µL de la solution Miniprep Express Matrix™ sont ajoutés. Le mélange est homogénéisé puis centrifugé pendant 20 secondes. Le surnageant est jeté et remplacé par 500 µL d'éthanol 80%. Après une nouvelle centrifugation pendant 20 secondes, le surnageant est jeté et les tubes sont mis à sécher pour éliminer l'éthanol avant l'ajout de 50 µL d'eau. Les tubes passent une dernière centrifugation pendant 2 minutes. Le surnageant contient les plasmides extraits qui peuvent être digérés pour rechercher la présence d'un insert.
- Purification de plasmides pour transformation/transfection : le kit NucleoSpin® Plasmid est utilisé. Le protocole est réalisé en suivant la notice d'utilisation du fabricant.

2.2.1.7. Dosage de l'ADN

La concentration d'ADN obtenu après purification est évaluée à l'aide du spectrophotomètre FluoStar Omega (BMG Labtech). L'appareil mesure l'absorbance à 260 nm, en considérant qu'une absorbance de 1 est l'équivalent de 50 µg/mL d'ADN double brin.

Nom du guide	Gène cible, Organisme	Séquence (PAM)	Utilisation
TbPat_1125_revcom	TbPat, <i>T. brucei</i>	GAAGACCCGGAATATGCACG (AGG)	Ajout du tag 10TY en 3' de la séquence codante de TbPat
TbPat_176		GGGAAACGTGTTAGGTTCT (TGG)	Insertion d'une cassette STOP dans la séquence codante de TbPat
TcGK_1097	TcGK, <i>T. congolense</i>	ATTGGGACCCCTCGGCTCGT (GGG)	Insertion du gène de résistance à la phléomycine dans la séquence codante de TcGK
TcPLA_370	TcLysoPLA, <i>T. congolense</i>	ATAAGGGACGGGACCTTGA (AGG)	Insertion du gène de résistance à la phléomycine dans la séquence codante de TcLysoPLA

Tableau 5 : guides ARN.

PAM, *protospacer-adjacent motif*.

2.2.1.8. Séquençage

Les produits PCR ou plasmides d'intérêts sont tous séquencés par un service externe pour vérifier l'absence de mutation dans la séquence nucléotidique. La compagnie Eurofins séquence par la méthode de Sanger les séquences d'intérêt par le kit Mix2Seq (<https://eurofinsgenomics.eu/>). Les fragments d'ADN sont préparés selon les instructions fournies dans le kit. Les séquences sont ensuite analysées grâce au logiciel Geneious v7.0.6.

2.2.2. Biologie cellulaire

2.2.2.1. Transfection de plasmides dans *T. brucei*

Trypanosoma brucei étant incapable de garder des plasmides circulaires en semi-autonomie dans la cellule, le plasmide d'intérêt doit être linéarisé pour une insertion dans le génome du parasite. Le plasmide pLew100, plasmide utilisé pour la transfection au cours de cette thèse, possède une séquence complémentaire à la séquence du rDNA spacer du parasite et peut s'y intégrer grâce à la machinerie de recombinaison homologue. Cette séquence contient le site de restriction spécifique à l'enzyme Not1, utilisée pour linéariser le plasmide. L'ADN est ensuite précipité pendant 24 heures à -20°C dans 1/10V d'acétate de sodium 3M et 2V d'éthanol 100%. La solution est ensuite centrifugée 30 minutes à 20 000 g. Sous PSM, le surnageant est jeté et remplacé par 500 µL d'éthanol 70% filtré. Après une nouvelle centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes, l'éthanol est enlevé et l'ADN est repris dans 10 µL d'eau stérile. La solution contient généralement entre 5 et 10 µg d'ADN. 1.10^7 parasites sont centrifugés à 400 g pendant 10 minutes puis lavés 2 fois en PBS. Les culots sont ensuite repris dans 60 µL de PBS. Les parasites sont mélangés aux 10 µL de plasmide linéarisé et la solution est complétée à 100 µL par 30 µL de tampon Amaxa™ Basic parasite Nucleofector™ Kit 2 (LonzaVMI.1021). La solution de 100 µL est placée dans une cuve d'électroporation. La transfection est réalisée avec l'appareil Amaxa Nucleofector™ (Lonza). Le programme utilisé pour *Trypanosoma brucei* est X-001, pour les formes procycliques et sanguines. Après électroporation, les cellules sont reprises dans 5 mL de milieu de culture approprié. Le lendemain, l'antibiotique de sélection approprié est ajouté dans le milieu de culture. La sélection prend entre 7 et 10 jours.

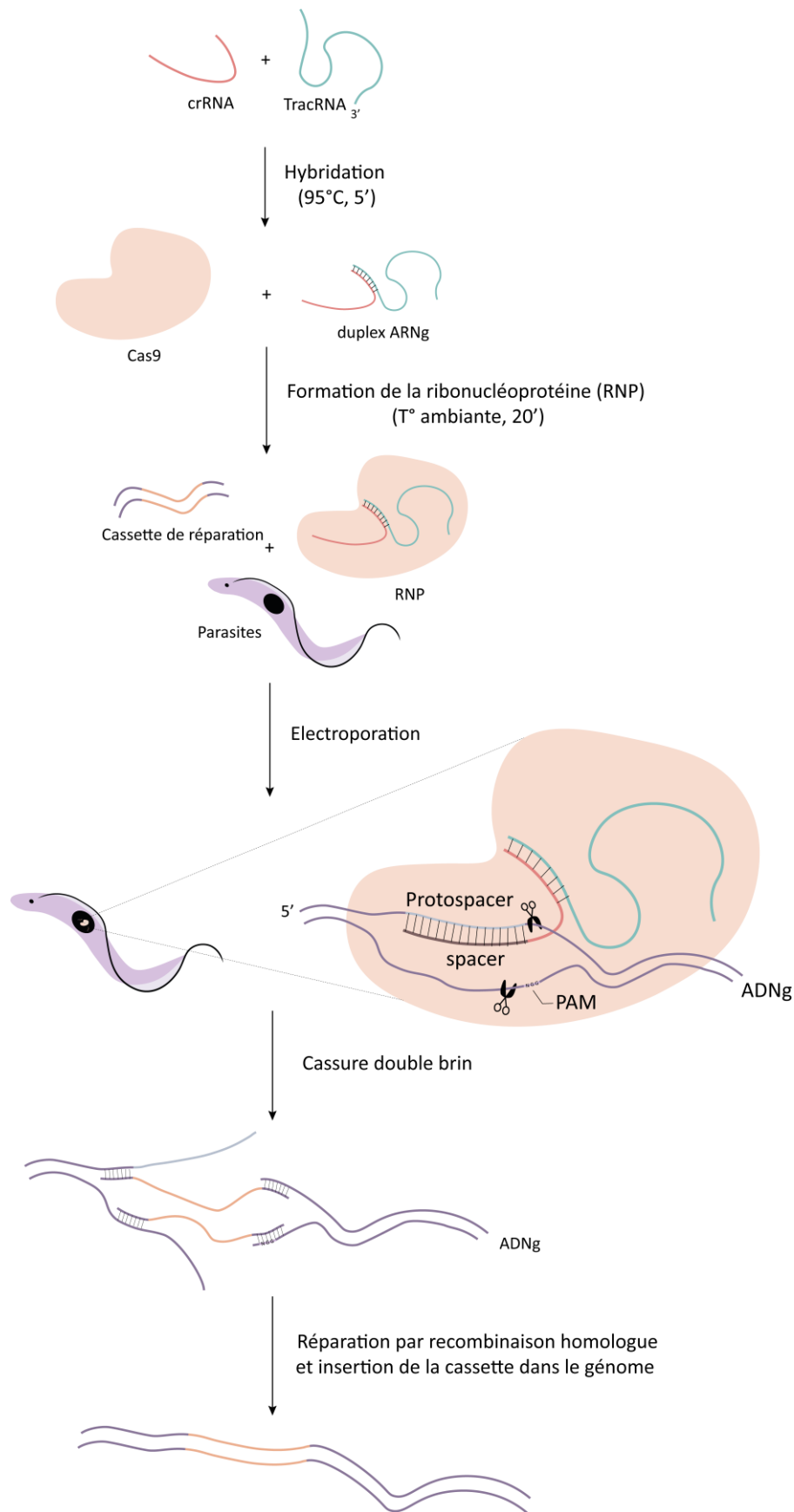


Figure 28 : Schéma du protocole de transfection de cassettes par le système CRISPR/CAS9 dans les trypanosomes africains.

D'après le protocole décrit dans (Asencio & Hervé et al. 2024). Réalisé sur Illustrator.

2.2.2.2. Transfection de cassettes par CRISPR/CAS9 dans *T. brucei* et *T. congolense*

Le protocole de modification du génome par CRISPR-Cas9 est basé sur le protocole décrit dans (Asencio & Hervé et al. 2024) (Figure 28). Cette méthode permet l'insertion d'une cassette d'ADN (site de restriction, gène de résistance à un antibiotique, tag, gène entier) dans le génome des parasites de manière efficace et sans sélection. La méthode consiste à former un duplex entre une partie d'une séquence courte d'ARN complémentaire à la séquence génomique d'intérêt (ARN guide) et d'un *transactivating CRISPR RNA* (tracrRNA). Le tracrRNA active l'enzyme recombinante Cas9, ici dérivée de l'organisme *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). SpCas9 reconnaît une séquence PAM (*protospacer adjacent motif*) de séquence 5'-NGG-3'. Toutes les séquences ADN des gènes d'intérêt ont d'abord été séquencées (Tableau 4). Les guides ARN (ARNg) sont ensuite choisis à l'aide de l'outil « *CRISPR guide design tool* » sur TriTrypDB (tritypdb.org) (Tableau 5). Les amorces, ARNg, tracrRNA et la Cas9 (Alt-R™ S.p. Cas9 Nuclease V3) proviennent du fabricant IDT (<https://eu.idtdna.com>). Le programme de transfection utilisé pour *T. brucei* est X-001 et U-033 pour *T. congolense* (Coustou et al. 2010). Après électroporation, les cellules sont transférées dans leur milieu de culture approprié. Pour les transfusions de cassettes contenant un gène de résistance à la phléomycine (BleR), l'antibiotique de sélection est ajouté le lendemain. Pour *T. congolense*, la sélection se fait par un ajout croissant de phléomycine, avec une concentration initiale de 0,5 µg/mL pour atteindre une concentration maximale de 2 µg/mL (Tableau 3).

2.2.2.3. Clonage des parasites

T. brucei et *T. congolense* peuvent être triés grâce au service de tri cellulaire associé à la fluorescence (FACS) disponible à la plateforme TBMCORE de l'Université de Bordeaux. Environ $5 \cdot 10^6$ cellules sont centrifugées, lavées et reprises dans 1 mL de PBS contenant 10% de SVF (*T. brucei*) ou 20% de sérum de chèvre (*T. congolense*). 200 µL de milieu de culture approprié pour chaque espèce/forme sont ajoutés dans les puits d'une plaque 96 puits. Pour *T. brucei* forme procyclique, du milieu consommé remplace le milieu SDM79 frais. Les parasites sont triés en utilisant le trieur BD FACSMelody™ Cell Sorter ou le trieur haut débit BD FACSAria™ III Cell Sorter. Si une fluorescence dépendante du système d'induction à la tétracycline est recherchée, 1 µg/mL de tétracycline est ajouté 24 heures avant le tri et seuls les parasites exprimant la GFP sont triés.

2.2.2.4. Courbes de croissance

Les parasites sont mis en culture au jour 0 (J0) de la courbe de croissance à une concentration de 1.10^6 cellules/mL pour les formes procycliques et 1.10^5 cellules/ml pour les formes sanguines, dans les milieux adaptés. La concentration des parasites dans le milieu de culture est comptée chaque jour à la même heure pour un comptage précis. Les compteurs de cellules utilisés sont le Guava® Muse® ou Guava® *easyCyte*TM dans le cas où la fluorescence de la GFP est mesurée. Après comptage, la concentration de parasites est diluée pour revenir à la concentration du J0 si la concentration atteinte est supérieure à 6.10^5 chez les formes sanguines et 1.10^7 chez les formes procycliques. Les courbes de croissances durent 5 jours pour les formes sanguines, 8 jours pour les formes procycliques.

2.2.2.5. Induction de la formation de gouttelettes lipidiques

Le mix oléate – BSA (*bovine serum albumin*) (section 2.2.3.4) est ajouté au milieu de culture contenant 1.10^6 parasites/mL pour *T. brucei* forme procyclique ou 1.10^5 parasites/mL pour *T. brucei* forme sanguine à une concentration finale de 400 μ M (Allmann et al. 2014). Les cultures incubent pendant 24 heures à une température appropriée pour chaque forme. Après 24 heures, les cellules sont centrifugées, lavées et préparées pour analyse.

2.2.3. Biochimie

2.2.3.1. Extraits protéiques totaux

Les parasites sont comptés à l'aide du compteur de cellules et centrifugés. Après 2 lavages au PBS, les parasites sont repris dans du SDS 2% à raison de 10 μ L pour 5.10^6 parasites. Pour dépôt sur gel d'acrylamide, les extraits totaux sont ensuite mélangés à un tampon de charge 4X Laemmli (SDS 20%, Tris-HCl pH = 6,8, 1M glycérol 100%, quelques mg de bleu de bromophénol et eau) contenant du β -mercaptoéthanol à 14,3 M. Les échantillons sont chauffés à 100°C pendant 10 minutes. Les échantillons peuvent être utilisés immédiatement pour migration sur gel ou être conservés à -20°C.

Anticorps	Espèce	Dilution	Source
Anticorps primaires			
Anti-Ty1	Souris	WB 1:500	iMET
		IF 1:250	
Anti-Enolase	Lapin	WB 1:100000	Paul Michels, Edimbourg
		IF 1:2000	
Anti-GFP	Lapin	WB 1:2000	Abcam
Anti-AceCS	Souris	WB 1:100	iMET
Anti-PFR	Souris	WB 1:1000	MFP
Anticorps secondaires			
Anti-Souris Alexa Fluor 488	Âne	IF 1:400	ThermoFisher
Anti-Lapin Alexa Fluor 594	Chèvre	IF 1:400	ThermoFisher
Anti-Souris HRP	Chèvre	WB 1:5000	Bio-Rad
Anti-Lapin HRP	Chèvre	WB 1:10000	Bio-Rad

Tableau 6 : Anticorps primaires et secondaires.

WB, Western-blot; IF, Immunofluorescence.

2.2.3.2. SDS-PAGE

Les extraits protéiques totaux migrent sur un gel de 10% de polyacrylamide (Mini-Protein® TGX Stain-Free™, Bio-Rad). 15 µL d'extrait total est déposé dans chaque puits. La migration se fait à 180 V pendant 1 heure dans une solution tampon Tris-glycine SDS 1X (Euromedex EU0510). Une fois la migration terminée, le gel est récupéré pour transfert sur membrane ou coloré au Bleu de Coomassie.

2.2.3.3. Western blot

Un gel de polyacrylamide contenant des extraits protéiques totaux ayant migré est transféré sur une membrane polyvinylidene difluoride (PVDF) pendant 7 minutes à 25 V et 1,3 Amp (Trans-blot® Turbo™ Bio-Rad). 15 mL d'une solution de tampon phosphate tween (PBS à 0,005% de Tween 20) contenant 5% de lait (Regilait®) sont utilisés pour saturer la membrane pendant 30 minutes. Les protéines d'intérêt sont ensuite détectées par incubation de la membrane avec 10 mL de PBST-5% lait contenant un anticorps primaire (Tableau 6) sur une nuit à 4°C. La membrane est lavée 3 fois avant incubation avec un anticorps secondaire (Tableau 6) couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) pendant une heure. La membrane est finalement lavée 3 fois. Les protéines d'intérêt sont révélées par la mise en contact avec un mélange 1:1 d'une solution de peroxyde et une solution luminol/enhancer (Clarity™ Western ECL Substrate, Bio-Rad) se couplant à la HRP. La membrane est imagée à l'aide du ImageQuant™ LAS 4000.

2.2.3.4. Solution oléate – BSA

L'ajout d'oléate dans le milieu de culture favorise la formation de nouvelles gouttelettes lipidiques dans les cellules. La solution d'oléate complexée à la BSA, qui permet l'adressage du lipide aux cellules, est préparée d'après le protocole proposé par (Song et al. 2022). Une solution stock de 10 mM d'oléate couplée à la BSA est préparée en dissolvant 2g de BSA dans 10 mL de PBS et en ajoutant goutte par goutte 32,15 µL d'acide oléique 99% (ThermoFisher 031997.06). Le mélange est chauffé à 37°C avec agitation pendant une heure puis est filtré (0,22 µm). La solution est conservée à 4°C pendant un mois maximum.

2.2.3.5. Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

L'analyse RMN permet d'observer les métabolites excrétés par les parasites. Des cultures de *T. congolense* en phase exponentielle de croissance sont centrifugées à 400 g pendant 10 minutes et lavées dans 10 mL de PBS-NaHCO₃ (5 g/L). 4.10⁷ cellules/condition sont placées dans une plaque 24 puits. Le puits est complété par ajout de PBS-NaHCO₃ et la source de carbone d'intérêt (1 mM [U-¹²C] glucose et 5 mM [U-¹³C] glycérol) pour un volume final de 1,5 mL. Après un temps d'incubation de 1h30 à 34°C, les cellules sont centrifugées et 1,2 mL de surnageant est récupéré pour analyse RMN. Les analyses RMN ont été réalisées par Marc Biran au Centre de Résonance Magnétique des Systèmes Biologiques de Bordeaux.

2.2.3.6. Protéomes totaux

Des échantillons ont été préparés pour analyse de spectrométrie de masse ; chaque protéome a été préparé en triplicata, avec une culture de 10⁸ cellules/réplicat. Les cultures sont centrifugées et lavées dans du milieu de culture approprié sans sérum. Les culots sont ensuite repris dans 200 µL d'une solution de lyse préparée extemporanément et préalablement refroidie à 4°C contenant 4% de SDC (sodium déoxycholate) dans 100 mM Tris-HCl à pH = 8 et un cocktail d'inhibiteur de protéases. Les solutions sont placées à 95°C pendant 5 minutes pour faciliter la lyse et inactiver les protéases et phosphatases puis les lysats sont homogénéisés par sonication à 4°C pendant 5 cycles de 30 secondes à puissance maximale. Les échantillons sont stockés à -80°C jusqu'à l'analyse au spectromètre de masse par Stéphane Claverol au Centre d'Appui à la Recherche et de Formation de Bordeaux.

2.2.4. Imagerie

2.2.4.1. Immunofluorescence

1.10^7 cellules sont lavées 2 fois en PBS et fixées dans 400 μ L de PBS – PFA 2% pendant 10 minutes. Le PFA est neutralisé par l'ajout de 40 μ L de 1 M glycine. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois en PBS et reprises dans 600 μ L de PBS. Les parasites sont déposés sur des lames superfrost (J7800AMNZ, EpreDia) dont les puits sont préalablement dessinés à l'aide d'un PAP-PEN (Kister Biotech). Après sédimentation des cellules sur la lame, environ 10 minutes pour *T. brucei* forme procyclique et une nuit pour *T. brucei* forme sanguine et *T. congolense*, les cellules sont perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,05% pendant 3 minutes. Le Triton X-100 est lavé 3 fois avec du PBS puis les sites aspécifiques sont bloqués à l'aide d'une solution de PBS-BSA 4% pendant 20 minutes. Les solutions contenant les anticorps primaires (Tableau 6) sont ensuite déposées sur chaque puits. Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires (Tableau 6) sont déposés et incubent 45 minutes à l'abri de la lumière. Les puits sont lavés 3 fois au PBS puis un marquage de l'ADN est fait par ajout de de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma D9542) à 10 mg/mL.

Pour éviter le photoblanchiment, une goutte de Gold slowfade (Invitrogen S36936) est déposée sur chaque puits. Une lamelle est ensuite posée sur la lame et scellée par du vernis. Les images sont acquises sur le microscope Leica DM5500 B avec le logiciel MetaMorph. Les images sont analysées sur Fiji (Schindelin et al. 2012).

2.2.4.2. Marquage des gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques sont marquées par des colorants spécifiques des lipides neutres. Le Nile Red (ThermoFisher N1142), qui émet à la fois dans les canaux rouge et vert, est utilisé lors du marquage simple des LD chez les parasites déposés sur lame. Du PBS contenant 1 μ g/mL de Nile Red est déposé sur les puits pendant 30 minutes avant lavage et marquage au DAPI. Pour les expériences d'immunofluorescences et tests de colocalisation, le Lipi-Blue (Dojindo LD-01), qui émet dans le bleu, est utilisé à une concentration de 0,1 μ mol/L et incubé pendant 30 minutes à l'abri de la lumière après lavage des anticorps secondaires. Un marquage de l'ADN n'est pas effectué dans ces conditions.

```

run("Duplicate...", "title=Comptage.TIF");

Dialog.create("Choix de l'objectif");
Dialog.addChoice("Objectif du microscope", newArray("63x", "100x"));
Dialog.show();

choixObjectif = Dialog.getChoice();
if (choixObjectif == "63x") {
    run("Set Scale...", "distance=9.76753 known=1 unit=µm");
} else if (choixObjectif == "100x") {
    run("Set Scale...", "distance=15.50387 known=1 unit=µm");
}

run("Threshold...");

waitForUser("1-Modify the threshold to highlight the tryps area\n2-Press apply \n3-Once done, click
Ok");

run("Threshold...");

setOption("BlackBackground", true);

run("Convert to Mask");

run("Set Measurements...", "area mean centroid perimeter shape display add redirect=None
decimal=3");

```

Figure 29 : Script de la macro utilisée sur Fiji pour la quantification de l'aire des gouttelettes lipidiques.

2.2.4.3. Quantification des gouttelettes lipidiques

Pour déterminer le nombre de gouttelettes/parasites, 100 parasites par condition sont comptés manuellement. L'aire des gouttelettes lipidiques a été déterminée à l'aide d'une macro développée sur Fiji (Figure 29). Cette macro simple à utiliser en grossissement 63x ou 100x sur le canal d'intérêt marquant les LD consiste à effectuer dans un premier temps un seuillage pour se limiter à la zone de fluorescence des LD, formant un masque. Ensuite, l'aire des LD est mesurée grâce à la fonction Analyze Particles. Pour déterminer l'aire des LD, 100 gouttelettes par condition sont analysées.

2.2.5. Statistiques et traitement des données

2.2.5.1. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad) avec le test statistique approprié pour chaque type d'analyse : t-test de Student (comparaison de 2 groupes) ou ANOVA one-way (comparaison de plus de 2 groupes). Les résultats sont présentés avec leur moyenne et écart-type.

2.2.5.2. Analyse des données de protéomique sur les parasites sauvages et Δ TbPat

Les représentations graphiques issues des résultats de protéomique et d'enrichissement GO (*Gene ontology*) et de localisation sur les protéomes totaux ont été réalisées en utilisant le logiciel R version 4.4.1 et en s'appuyant sur les données disponibles sur la base de données TriTrypDB et TrypTag.

Pour les résultats de protéomique sur les parasites sauvages ou Δ TbPat avec ou sans oléate, les ratios d'abondance ont été utilisés pour déterminer la différence d'expression entre deux conditions. Seules les protéines présentes dans les trois réplicats dans les conditions d'intérêt ou présentes dans les trois réplicats d'une condition et absentes dans les trois réplicats de l'autre condition, représentées par plus d'un peptide et dont la moyenne d'abondance dépasse 1.10^5 pour au moins une des deux conditions ont été sélectionnées pour l'analyse. Pour la représentation graphique, les protéines ayant une expression différentielle significative entre conditions (ratio) sont sélectionnées sur deux critères : i) un ratio inférieur à 0,5 ou supérieur à 2 et ii) une p-value de ce ratio inférieure à 0,05.

Ces protéines ont été regroupées dans un tableau. Les conditions choisies ici sont : Δ TbPat/sauvage, sauvage + oléate/sauvage, Δ TbPat + oléate/ Δ TbPat. Pour les représentations graphiques en Volcano plot, les ratios sont reformulés en \log_2 et les p-value en $-\log_{10}$ sur R.

L'enrichissement GO permet de connaître l'enrichissement d'un set de gènes par rapport au génome entier. Les protéines montrant une expression différentielle pour les différentes comparaisons ont été soumises à l'analyse GO pour le processus biologique sur TriTrypDB pour connaître les aspects enrichis dans les sets de données obtenus. La localisation de chaque protéine a été vérifiée sur TrypTag.

3. Résultats

3.1. Amélioration de la technologie des ciseaux moléculaires CRISPR/CAS9 chez la forme sanguine de *Trypanosoma congolense*

3.1.1. “*Streptococcus pyogenes* Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in *Trypanosoma* and *Leishmania*”

3.1.1.1. Présentation de l'article

La technologie CRISPR/CAS9 est un système d'édition précise du génome et représente une technique de choix en biologie moléculaire. Elle est dérivé d'un système de défense naturel des bactéries et archées, découvert au début des années 2000 et aujourd'hui utilisé dans la recherche pour l'édition, la correction et la modification de gènes de manière précise et efficace. Cette technologie est applicable à l'étude des pathogènes, dont font partis les Kinétoplastidés comme *Trypanosoma* et *Leishmania*, parasites unicellulaires flagellés responsables de maladies chez l'Homme et les animaux au niveau mondial. Comprendre la biologie de ces parasites nécessite en effet de pouvoir manipuler leur génome. Des systèmes CRISPR/CAS9 ont ainsi été développés chez ces organismes, avec pour la majorité l'expression endogène constitutive ou inductible chez *T. brucei* de l'enzyme Cas9 et des guides ARN, ce qui apporte une possibilité d'effet dit « *off-target* » avec des modifications aléatoires dans le génome des parasites. Une alternative est le développement de Cas9 recombinantes, ce qui a été précédemment réalisé chez *Trypanosoma* et *Leishmania*, en utilisant la Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), une Cas9 plus petite que celle de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), Cas9 la plus utilisée et commercialisée.

Dans cette étude, nous avons démontré que SpCas9 est fonctionnelle après transfection de complexes Cas9/ARNg chez les formes procyclique et sanguine de *T. brucei*, *T. congolense* ainsi que chez les promastigotes de *Leishmania*. Nous avons étiqueté ou inactivé plusieurs gènes chez ces parasites, dont des familles multigéniques entières, sans utiliser de marqueurs de sélection et avec une très forte efficacité de transfection, et ce avec une SpCas9 produite au laboratoire ou avec une SpCas9 commerciale (IDT). Nous avons constamment obtenu une forte proportion d'homozygotes lors de l'inactivation de gènes non-essentiels, avec l'intégration des cassettes sur les deux allèles.

Ainsi, ce système CRISPR/CAS9 présente plusieurs avantages : i) expression transitoire de l'enzyme Cas9, ce qui prévient les effets « *off-target* » possiblement dus à l'expression constitutive de la Cas9, ii) possibilité de viser les deux allèles voire des familles multigéniques en une seule transfection chez des gènes non-essentiels et iii) pas d'utilisation de marqueurs de sélection, permettant de réaliser plusieurs mutants dans une même lignée cellulaire.

3.1.1.2. Article

3.2. Caractérisation de TbPat

3.2.1. "A patatin-like phospholipase is essential to lipid droplet dynamics in *Trypanosoma brucei*"

3.2.1.1. Présentation de l'article

Trypanosoma brucei est un parasite protozoaire possédant un cycle évolutif complexe alternant entre un hôte mammifère et un insecte vecteur, la mouche tsé-tsé, présente en Afrique Sub-saharienne. Pour survivre aux différents milieux qu'il rencontre, le parasite montre de grandes capacités d'adaptation avec des modifications rapides de sa morphologie, son protéome et son métabolisme. Dans ce contexte, l'acquisition et la mobilisation de nutriments comme les lipides sont essentiels pour le parasite et sont régulées par des enzymes comme les phospholipases. Pour répondre à ces besoins, *T. brucei* possède une plateforme métabolique capable de stocker et distribuer des lipides, les gouttelettes lipidiques. Les connaissances sur ces gouttelettes, leur contenu et les protéines impliquées sont très limitées.

Dans cette étude, nous avons caractérisé la première phospholipase associée aux gouttelettes lipidiques chez *T. brucei*, TbPat. Nous avons montré par imagerie que TbPat est localisée à la surface des gouttelettes lipidiques chez les formes insecte (procyclique) et mammifère (forme sanguine) par l'intermédiaire d'un domaine hydrophobe situé en C-terminal de la séquence de la protéine. Nous avons également démontré que l'expression de TbPat est régulée par le parasite et répond à des signaux de régulation des gouttelettes lipidiques, notamment l'incorporation de l'oléate, acide gras induisant la formation de nouvelles gouttelettes chez le parasite. Dans ces conditions, l'expression de TbPat est fortement augmentée 24 heures après ajout de l'acide gras, suggérant l'existence d'un système de régulation de l'expression de protéines associées aux gouttelettes lipidiques et au métabolisme des lipides, déjà observé chez d'autres protéines impliquant dans la synthèse d'acides gras. De plus, cet apport en oléate a des conséquences différentes au cours du cycle évolutif, puisqu'il n'a pas d'effet chez les formes procycliques mais est léthal pour les formes sanguines.

La surexpression de TbPat n'a pas montré d'effet sur la taille des gouttelettes lipidiques, mais la délétion de la protéine a un effet majeur sur les deux formes du parasite, avec une augmentation significative de la taille des gouttelettes et une diminution de la capacité de production de nouvelles gouttelettes en présence d'oléate, reflétant l'importance de la protéine dans l'intégrité de la biologie des gouttelettes lipidiques. L'étude des potentiels résidus actifs de TbPat a permis de démontrer par mutagenèse dirigée que la protéine est une enzyme dont l'activité dépend de la sérine canonique des lipases. Enfin, nous avons cherché à comprendre comment la délétion de TbPat affectait le protéome des deux formes de *T. brucei* en réalisant une analyse par spectrométrie de masse ; nous avons pu observer que chez la forme sanguine, la délétion de l'expression de la lipase a un effet majeur sur les protéines métaboliques mitochondriales du parasite en induisant une augmentation significative de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme de l'acétate, précurseur essentiel de la synthèse des lipides, et du cycle de Krebs. Cette analyse montre l'importance des gouttelettes lipidiques dans la régulation des besoins énergétiques des parasites.

En conclusion, cette étude a permis la caractérisation de la première phospholipase associée aux gouttelettes lipidiques chez *T. brucei* et apporte de nouvelles données sur un compartiment encore très peu étudié chez les parasites protozoaires et ses rôles dans le métabolisme des parasites.

A patatin-like phospholipase is essential to lipid droplet dynamics in *Trypanosoma brucei*

Perrine Hervé¹, Yoshiki Yamayo-Botté², Stéphane Claverol³, Emmanuel Tetaud¹, Frédéric Bringaud¹, Cyrille Botté², Loïc Rivière^{1*}

¹ Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, CNRS UMR 5234, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

² ApicoLipid Team, Institute for Advanced Biosciences, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, INSERM U1209, Grenoble, France.

³ Bordeaux Proteome, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* Corresponding author: loic.riviere@u-bordeaux.fr

Abstract

Lipid droplets (LD) are dynamic organelles crucial in lipid storage and distribution within cells. In *Trypanosoma brucei*, the protozoan parasite responsible for deadly diseases in humans and animals, lipid acquisition and mobilization is essential for its survival and adaptation to its different hosts, but the roles of LD in these processes remain largely unknown. In this study, we identify and characterize the first LD-associated patatin-like phospholipase in this parasite, TbPat. This active lipase localizes to the surface of lipid droplets through its C-terminal hydrophobic domain. The expression of this protein is tightly regulated by parasites and significantly increases after oleate-induced LD formation. Deletion of TbPat results in enlarged LD and a defect in the generation of new LD in oleate-rich conditions. Finally, deletion of the enzyme leads to the upregulation of several metabolic mitochondrial pathways, particularly acetate and the TCA cycle, in bloodstream-stage parasites.

These findings identify TbPat as a key regulator of LD dynamics and lipid metabolism balance in trypanosome parasites and provide new insights on the roles of LD in protozoan parasites.

Introduction

Trypanosoma brucei is a protozoan parasite found in Sub-Saharan Africa and responsible for sleeping sickness in humans or Nagana in livestock. This parasite exhibits a complex lifecycle, alternating between the bloodstream, skin and adipose tissue of a mammal host and the midgut and salivary glands of its vector, the bloodsucking tsetse fly¹. To complete this cycle and survive within its hosts, *T. brucei* shows great capacities of adaptation, with quick modifications of its morphology, protein expression pattern and metabolism². Acquisition, synthesis and mobilization of nutrients, such as lipids, is therefore essential for the parasite³. These molecules are involved in several cellular processes, including energy metabolism, cellular signaling pathways, immune response as well as the maintenance and renewal of cellular membranes and in *T. brucei*'s case, the maintenance of the lipid anchors of the glycosylated proteins that surrounds its cell surface^{3,4}. To satisfy its lipid needs, *T. brucei* utilizes different systems depending on its form: parasites found in mammals mostly rely on the endocytosis and degradation of host lipoproteins^{5,6}, while insect form parasites synthesize their own lipids, using mitochondrial acetate as a precursor^{7,8}.

Manipulation and remodeling of these lipids is orchestrated by lipases. This diverse group of enzymes catalyze the hydrolysis of lipids and are classified based on their site of action and substrates⁹. The superfamily of phospholipases A₂ (PLA₂), which hydrolyze phospholipids into fatty acids and lysophospholipids, is notably known for their role as virulence factors in several pathogens, including protozoan parasites, as recently reviewed¹⁰. Patatin-like phospholipases (PNPLA) are PLA₂ ubiquitously found in procaryotes and eucaryotes and possess a broad substrate specificity: phospholipids, triacylglycerols (TAG), lysophospholipids, cholesteryl/retinyl esters... The activity of PNPLA depends on a serine-aspartate catalytic dyad, with the catalytic serine found in a G.X.S.X.G consensus motif¹¹. In humans, most of the PNPLA enzymes are closely associated with an atypical compartment called lipid droplets (LD)¹². This organelle, which takes its origin in the endoplasmic reticulum (ER) membrane, exclusively contains neutral lipids such as TAG and sterol esters (SE) and is surrounded by a monolayer of phospholipids instead of a bilayer¹³.

This highly dynamic compartment has gained an exponential interest in the last decades due to its potential roles in key cellular processes and pathways¹⁴⁻¹⁶. This metabolic platform stores and distributes lipids by interacting with many different cellular compartment: ER, mitochondria, peroxisomes... to fuel and regulate energy demands¹⁷, but more roles have recently been attributed to this organelle: regulation of inflammation during infections, prevention of cell death during starvation or lipid toxic accumulation (known as lipotoxicity), protection from ER stress, protein sequestration, stem cell proliferation...¹⁸ Dysregulation of these pathways by mutations in LD-associated proteins is closely associated with metabolic and neurodegenerative diseases, and cancers^{14,15}. Furthermore, LD are temporary organelles, regulated by hydrolytic processes known as lipolysis and lipophagy¹⁹. Thus, lipid droplets represent a vital organelle for the survival of organisms.

The functions, proteome and lipidome of LD in pathogens represent an emerging interest. Recent studies have already shown that LD from both the parasite and the mammalian host are critical for the survival and differentiation of *Plasmodium* and *Toxoplasma* parasites²⁰⁻²⁵ and are involved in the production of inflammation factors such as prostaglandin in *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi*²⁶⁻²⁸. In *T. brucei*, the knowledge on LD is scarce, with only two associated proteins identified. The first is a LD-bound kinase called LDK, involved in an undetermined process in the organelle biology; knock-down of this protein results in a drastic diminution of LD without a significant effect on parasite growth²⁹. The second is a phosphatidic acid phosphatase or lipin (TbLpn), responsible for the production of TAG in the parasite. Knock-down of TbLpn results in a decrease of LD and a major growth defect in the procyclic insect form of *T. brucei*³⁰. To understand the biological functions of this atypical compartment in pathogens and more generally in eucaryotes, but also its mechanistic of emergence, maintenance and recycling, it is necessary to characterize proteins that help orchestrate its biology.

We describe in this study the first LD-associated PNPLA in protozoan parasites. We called this novel enzyme TbPat and showed that it is an active lipase that localizes to the periphery of lipid droplets, and its expression is highly regulated by the parasite, correlating with the accumulation of lipid droplets.

Deletion of TbPat resulted in significant alterations of lipid droplet morphology and lipid metabolism in both insect procyclic form (PCF) and mammal bloodstream form (BSF) of *T. brucei*, as well as an upregulation of the BSF mitochondrion metabolic proteome.

Results

Tb927.4.1780 is a predicted patatin-like phospholipase

TbPat was discovered through a combined text search for 'Patatin' and motif pattern search for 'G.X.S.X.G' in the TriTryp database (<https://tritrypdb.org>), yielding a unique candidate with the identifier Tb927.4.1780. Both gene and protein sequences of TbPat exhibit a high degree of similarity (>60%) among kinetoplastids, but share less than 12% identity with Patatins from other parasites such as apicomplexan. The protein possesses a predicted hydrophobic domain from amino acid 298 to 321 (Fig. 1a) (www.tritrypdb.org). Preliminary localization data from the TrypTag database suggests that TbPat is associated with lipid droplets³¹. Patatins are known for their diverse enzymatic activities, including phospholipase A2 (PLA2), acyltransferase, glycolipase, esterase, and non-specific lipid acid hydrolase activities¹¹. To gain structural insights, we employed AlphaFold3 (<https://alphafoldserver.com>)³² to model TbPat and aligned it with Pat17, one of the best structurally characterized Patatins³³ (Fig 1b). The putative active site is highly conserved, with a Serine residue at position 68 in TbPat (corresponding to position 77 in Pat17) and an Aspartate residue at position 194 in TbPat (position 215 in Pat17) (Fig. 1d and Fig. S1). Altogether, the localization and presence of critical active site residues suggest that TbPat could possess enzymatic activity and be involved in metabolic processes.

TbPat localizes to lipid droplets

As said previously, according to the TrypTag database, both N- or C-terminal mNeonGreen-tagged versions of TbPat seem to localize to lipid droplets (LD)³⁴. To confirm this subcellular localization, we fused TbPat to the C-terminal of GFP (GFP-TbPat) on a pLew100 plasmid for conditional expression in procyclics (PCF) parasites (Fig 2a). Western-blot analysis using an anti-GFP antibody confirmed the expression of the fusion protein after 5 days of tetracycline induction at the predicted molecular weight (Fig. 2b). Microscopy of fixed-tetracycline induced GFP-TbPat parasites confirmed the TrypTag annotation, as GFP-TbPat colocalized with the LD dye Lipi-blue

Interestingly, GFP-TbPat does not colocalize with all the LD of the parasite, indicating a potential role at a specific point of LD biology or an interaction with specific substrates/proteins (Fig. 2b). Moreover, the addition of this new copy of TbPat and its induction did not affect the number or size LD in *T. brucei* parasites (Fig. 2c).

In contrast to other compartments, there is no canonical targeting sequence for protein addressing to LD. Nevertheless, it has been demonstrated in higher eukaryotic organisms that the presence of hydrophobic sequences is essential for correct LD targeting in several proteins³⁵. Consistent with those observations, previous analysis of the *T. brucei* LD-bound TbLDK protein showed that removal of the hydrophobic domain of LDK prevented protein association with the LD membrane²⁹. To investigate this question in TbPat, we generated a truncated version of the gene (base pair 1 to 894) lacking the genomic sequence coding for the predicted hydrophobic domain (TbPat Δ HD) and fused this truncated sequence to GFP (GFP-TbPat Δ HD) on the pLew100 plasmid for expression in PCF parasites (Fig. 2d). As depicted in Fig. 2e, microscopy revealed that GFP-TbPat Δ HD was found diffused in the cytosol and was no longer bound to *T. brucei* LD. Like GFP-TbPat parasites, expression of this fusion protein did not influence the number or the size of LD (Fig. 2f). Thus, the presence of a hydrophobic domain appears essential for the addressing of TbPat to lipid droplets³⁵.

To verify that this localization to lipid droplets was not only due to an overexpression of this added copy of TbPat or the presence of the GFP, we introduced a sequence coding for a 10TY tag to the 3' of both alleles of the endogenous TbPat genomic sequence (TbPat-10TY) in both PCF and BSF parasites using a CRISPR/CAS9 approach we recently developed³⁶ (Fig. 2g). PCR of the TbPat gene in clonal populations of parasites showed a correct insertion of the 10TY cassette (Fig. S2) and Western-blot then confirmed the expression of the TY tag at the expected molecular weight (Fig. 2h). Immunofluorescence analysis of fixed TbPat-10TY parasites showed a clear localization at the periphery of lipid droplets stained with Lipi-blue, in both PCF and BSF parasites (Fig. 2h). In summary, data from both the overexpressed and endogenously-tagged versions of TbPat confirms that the protein localizes to the monolayer of lipid droplets of *T. brucei*.

TbPat expression is regulated during lipid droplet formation

In normal culture conditions, *T. brucei* possess only one to two LD, but previous work from our group showed that lipid droplet formation can be induced by addition of oleate in the culture medium of PCF parasites, leading to a 4 fold increase of the number of lipid droplets³⁷. To understand the role of TbPat during LD dynamics, we investigated the regulation of the expression of TbPat in 10TY-tagged parasites following the addition of oleate in the culture medium in both procyclics and bloodstream parasites, as the effect of oleate feeding has not been studied in the latter form. As shown in Fig. 3a-b, we found that 24 hours after fatty acid supplementation, expression of TbPat significantly increases in PCF and BSF parasites, concomitant with the formation of new lipid droplets. Interestingly, as previously observed with the GFP-TbPat protein, endogenous TbPat does not appear to colocalise with all the lipid droplets in the cell (Fig. 3a), further suggesting that the protein responds and interacts with specific molecules. To our knowledge, TbPat is the first protein with such a pattern of expression during fatty acid feeding, and suggests the existence of an unknown regulatory system responding to environmental cues and regulating lipid droplet biology and lipid metabolism in *T. brucei*.

Finally, we observed that addition of oleate was lethal to BSF parasites; cells stopped growing after 24 hours in presence of the fatty acid and died after 4 days in the culture medium (Fig. 3c). This is consistent with a previous observation which showed that addition of exogenous fatty acids in the medium or induction of lipolysis in adipocytes/BSF trypanosomes co-cultures was deadly to the parasites³⁸.

Loss of TbPat causes lipid droplets and lipid metabolism alterations

We explored the function of TbPat in *T. brucei* parasites by disrupting both alleles of the gene encoding for TbPat (Δ TbPat) using CRISPR/CAS9. To achieve this, we inserted a short cassette containing STOP codons in all three reading frames surrounding a restriction site absent in the TbPat gene, here HapI³⁶ (Fig. 4a). Integration of the cassette was confirmed by PCR and digestion by HpaI (Fig. 4b) followed by sequencing of the TbPat gene (Fig. S3). We then compared the size of lipid droplets in wild-type and Δ TbPat cells in PCF and BSF parasites using Nile Red. Deletion of TbPat led to an increase in lipid droplet size by around 3 fold in PCF parasites and 2 fold in BSF parasites (Fig. 4d) but had no impact on cell growth in both forms.

However, addition of oleate induced significantly less new LD in Δ TbPat than in wild-type cells in both PCF and BSF parasites (Fig. 4e). In PCF parasites, exposure to the fatty acid slightly affected growth of Δ TbPat parasites and BSF parasites, it completely prevented growth, as observed with wild-type cells (Fig. 4f).

To confirm that the observed phenotype was solely attributed to the loss of TbPat, we generated an add-back cell line by introducing the plasmid containing the GFP-TbPat construct into Δ TbPat PCF parasites (Δ TbPat::GFP-TbPat) (Fig. 5a). Cell imaging of induced Δ TbPat::GFP-TbPat parasites validated the restoration of the wild-type phenotype, with a significant reduction in the size of LD compared to non-induced Δ TbPat::GFP-TbPat cells (Fig. 5c).

The catalytic site serine is essential for TbPat activity

Phospholipases are serine hydrolases, with their catalytic site found within a consensus G.X.S.X.G motif⁹. To test the activity of the protein, we attempted to express and purify a recombinant TbPat in several heterologous expression systems. We were however unsuccessful in expressing the protein, likely due its toxic nature. While we could not obtain direct proof of PLA activity from a recombinant TbPat, we explored its potential as a phospholipase by performing site-directed mutagenesis on the predicted catalytic serine of TbPat, converting it to alanine (S68A). We engineered this construct in the GFP-TbPat plasmid (GFP-TbPat^{S68A}). The presence of the mutation was verified by sequencing (Fig. S3). Δ TbPat parasites were transfected with this new plasmid (Δ TbPat::GFP-TbPat^{S68A}). While this mutated protein was still able to localize to the LD periphery (Fig. 5b), unlike the GFP-TbPat native protein, induction of GFP-TbPat^{S68A} did not result in a significant decrease of lipid droplet size in Δ TbPat parasites (Fig. 5c). Hence, presence of the active serine is essential and sufficient for TbPat enzymatic activity. Interestingly, induction of the protein in presence of oleate led to an important growth defect in PCF parasites, which was much more important than the one observed in Δ TbPat parasites fed with oleate (Fig. 5d).

TbPat deficiency upregulates the mitochondrion metabolic proteome in bloodstream parasites

Finally, we investigated the consequences of the loss of TbPat on the whole proteome of *T. brucei* along its lifecycle. To do so, wt and Δ TbPat PCF and BSF parasites were analyzed by mass spectrometry.

We then focused our analysis on proteins that had an abundance ratio strictly lower than 0.5 or greater than 2 in the Δ TbPat cell line compared to the wt one, with a confidence interval greater than 95% (Fig. 6a). All proteins meeting these criteria are listed in supplemental table S2.

In PCF parasites, deletion of TbPat had a significant effect on several mitochondrial and cytoskeleton proteins, with consequences on proteins involved in RNA processing or post-translation regulation, further suggesting the existence of a LD regulatory mechanism. Nonetheless, no obvious pathway or biological process seemed affected by this deletion. The majority of affected proteins are hypothetical and have no computed functions or processes, but remain candidates for future studies on LD biology.

A more striking phenotype was observed in BSF parasites, where the loss of TbPat in BSF parasites led to a global upregulation of metabolic enzymes found in the mitochondrion (Fig. 6c-d). Notably, proteins involved in acetate metabolism and the TCA cycle represent the majority of upregulated proteins in the knock-out cell line. It is worth noting that the expression of the majority of these enzymes, while upregulated in Δ TbPat parasites compared to wild-type BSF cells, did not reach the level of expression of wild-type PCF parasites. Furthermore, we did not see any upregulation of the electron transport chain, which is inactive in bloodstream parasites³⁹, indicating that oxidative phosphorylation is still inactive and not functional in these parasites.

Discussion

In recent years, the growing interest towards lipid droplets and their biology have revealed their critical roles in the regulation in many cellular processes in higher eukaryotes and their impacts on mammalian health: metabolic diseases⁴⁰, cancers¹⁵, neurodegenerative diseases⁴¹ or host-pathogen interactions⁴². In protozoan parasites such as *Plasmodium* or *Leishmania*, the interest for this organelle is even more recent but already reveals key functions to ensure survival inside the hosts. Given the importance of the lipid metabolism in these organisms, we focused our study on enzymes implicated in the regulation of lipids and identified the first LD-bound lipase in protozoan parasites, which we named TbPat. This enzyme shares key functional domains with other parasitic and human patatin-like phospholipases, ubiquitous PLA₂ enzymes with broad substrate activity.

Several human PNPLA enzymes also interact with lipid droplets, although their roles differ from enzyme to enzyme: for example, while PNPLA2/ATGL is the first and major step of lipolysis and is upregulated during fasting to produce glycerol that will later enter gluconeogenesis, PNPLA3 or adiponutrin is regulated in the opposite direction, suggesting that this enzyme is involved in lipogenesis¹². TbPat constitutes a new PNPLA enzyme discovered in an ancestral eukaryote.

Addition of a tag to the endogenous TbPat sequence allowed us to monitor the protein expression during lipid droplet dynamics; whereas the basal expression of the protein was very low in normal culture condition, addition of oleate significantly increased the expression of TbPat after 24 hours. This pattern of inducible expression has not been observed before in *T. brucei* and suggest the existence of subsets of proteins involved in LD biology and/or lipid metabolism regulated by an unknown mechanism. It was previously shown that the endoplasmic reticulum ELO pathway, which aims to produce longer fatty acids, is regulated during lipid availability, with an upregulation of protein expression in lipid-poor environment and a downregulation in the presence of exogenous fatty acids⁴³. Our observation, which goes in the opposite direction, suggests that TbPat is involved in the mobilization of fatty acids in lipid-rich environments, reflecting the great metabolic plasticity of parasites.

Deletion of this enzyme had no growth effect on *T. brucei* along its lifecycle, but showed significant modifications of the parasite's lipid droplet size and its total proteome. Indeed, we observed in both PCF and BSF parasites that deletion of TbPat led to a striking enlargement of LD, a phenotype never observed before in protozoan parasites. Δ TbPat parasites were also much less efficient at building new LD during fatty acid feeding, although we don't know if this is due to a deficiency in their ability to metabolize oleate, to generate new LD or an issue in LD turnover. Overexpression of TbPat through a GFP-TbPat fusion protein did not have any impact on LD area, but the complemented strain did restore a wild-type like phenotype, indicating that this overexpressed version is active but does not induce degradation of LD, unlike ATGL/PNPLA2⁴⁴.

Analysis of the total proteome of procyclic and bloodstream *T. brucei* showed stage-specific implications of lipid droplets.

The majority of proteins impacted by the deletion of TbPat in procyclic cells is hypothetical, but the few identified biological processes retrieved show the involvement of a potential regulatory machinery in LD metabolism, with proteins involved in RNA processing, post-translational regulation and protein modification. Changes in the expression of cytoskeletal proteins may also be due to a regulation of lipid transfer between organelles through interorganelle communications, in which the cytoskeleton is involved⁴⁵. In bloodstream parasites, deletion of TbPat had a major effect on mitochondrial metabolic enzymes, with an upregulation of many enzymes involved in the TCA cycle and acetate metabolism. In this form, the majority of the ATP production is dependent on glycosomes, peroxysomes-like compartments specific to kinetoplastids⁴⁶, and the mitochondrion is much less active than in PCF parasites. Thus, we can hypothesize that in BSF parasites, where the lipid metabolism mostly depends on the acquisition of nutrients from endocytosis, a defect in storage capacity and lipid availability may act as a sensor to regulate the energy metabolism machinery. Upregulating mitochondrial proteins may allow the parasite to synthesize some of its own lipid through the production of acetate, an important precursor for lipid biosynthesis in *T. brucei*^{7,8}. In PCF parasites, where the mitochondrion and fatty acid biosynthesis pathways are highly active, alteration of lipid droplets and lipid metabolism may already be compensated by the parasite's other pathways². This dysregulation had however no impact on the growth of *T. brucei*, suggesting that the activity of enzymes is sufficient to produce enough energy and lipids to ensure parasite survival in *in vitro* culture conditions.

Our work opens a new avenue putting evolutionary early-divergent micro-organisms in a new spotlight to understand LD biology, and potentially use them as model to study organelle dynamics.

Materials and methods

Trypanosomes culture and transfections

The procyclic form of *T. brucei* EATRO1125.T7T (TerR-HYG-T7RNAPOL-NEO) was cultured at 27°C with 5% CO₂ in SDM79 (Semi-Defined Medium) containing 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 5 µg/ml hemin, 25 µg/ml hygromycin and 10 µg/ml neomycin. The bloodstream form of *T. brucei* AnTat 1.1 90:13 (TerR-HYG-T7RNAPOL-NEO) was cultured at 37°C with 5% CO₂ in IMDM (Iscove's Modified Dulbecco Medium) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum, 0.2 mM β-mercaptoethanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0.16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM bathocuproine, 1.5 mM L-cysteine, 5 µg/ml hygromycin and 2.5 µg/ml neomycin. Cell growth and fluorescence was monitored daily by cell counting using the cytometer Guava® easyCyte™. All growth curves were made in three independent replicates and averaged for graphical representation. Transfections were performed using the Amaxa Nucleofector®II, program X-001 and parasites were selected in the appropriate medium.

Endogenous tagging and inactivation of TbPat with CRISPR/CAS9

Mutations of the endogenous sequence of TbPat were achieved using the CRISPR/Cas9 technology according to a previous paper³⁶. For TbPat inactivation, a cassette encoding for the HpaI restriction site surrounded by successive STOP codons and flanked by around 40 bp homologous to the 5' and 3' of TbPat surrounding the Cas9 cutting site was used as a donor sequence. A similar approach was used for the endogenous tagging, using a 10TY cassette flanked by the 5' and 3' sequences homologous to TbPat. 1.106 parasites were transfected with 1 µg of purified cassette, 30 µg of Cas9 (IDT) and pre-annealing TracrRNA (0.4 µmol) (IDT) and gRNA (0.4 µmol). Cells were cloned using a cell sorter (TBMCore Facility, Université de Bordeaux) and selection of double mutants was done by DNA extraction of clonal populations using the prepGEM® Bacteria kit (PBA0500, MicroGEM) followed by PCR amplification. For selection of ΔTbPat double mutants, the PCR product was digested with HpaI. gRNA were designed using EuPaGDT (<http://grna.ctegd.uga.edu/>) and TriTrypDB (tritrypdb.org). Primers and gRNA were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) and are listed in Table S1.

Plasmid transfection and inducible expression of TbPat

All plasmid constructs were made in the pLew100 tetracycline-inducible expression vector (phleomycin resistance), into which a GFP was previously inserted (pLew100GFP-X). The TbPat gene was amplified and cloned into NdeI and XbaI (GFP-TbPat and GFP-TbPat Δ HD) or XhoI and NdeI (GFP-TM) restriction sites of pLew100GFP-X. Parasites were transfected and selected in SDM79 supplemented with 5 μ g/ μ L of phleomycin. Expression of the fusion protein was induced by adding 1 μ g/mL of tetracycline. Primers used for the constructions are listed in Table S1.

BSA-Oleate solution

A stock solution of 10 mM oleate was prepared by mixing 10 mL of PBS containing 20% of BSA with 32.15 μ l of oleate (ThermoFisher 031997.06) drop by drop and shaking at 37°C for 1 hour. The solution was filtered (0.22 μ m) and kept at 4°C for short-term storage.

Immunofluorescence

Cultured cells were collected by centrifugation and washed with PBS before fixation with 2% paraformaldehyde for 10 minutes. 0.1 mM glycine was then added for 10 minutes to stop the reaction. Cells were spread on slides and permeabilized with 0.05% Triton X-100, followed by a 20 minute-incubation with PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA). Cells were then incubated for 1 hour with primary antibodies (GFP 1:2000, AceCS 1:100, TY 1:250) diluted in PBS-BSA 4%, washed with PBS and incubated with secondary antibodies and Hoechst (5 μ g/ml) diluted in PBS-BSA 4%. Slides were washed with PBS and mounted with SlowFade Gold (Molecular Probes). For lipid droplet staining, 0.1 nmol/mL of Lipi-Blue (Dojindo LD-01) was used in colocalization assays and in GFP-tagged strains while 1 μ g/mL of Nile Red was used in other experiments. Fig. S2 shows that Nile Red and Lipi-blue colocalize and are therefore interchangeable. Images were acquired with MetaMorph software on a Leica DM5500 B microscope and processed with ImageJ.

Quantification of lipid droplets with Image

An ImageJ macro was developed to efficiently quantify the area of lipid droplets in each cell line. The script is presented in Fig. S4.

Site-directed mutagenesis

The serine 68 of TbPat was mutated to an alanine using the pLew100GFP-TbPat plasmid as a template. Two complementary primers were synthesized by IDT (Table S1) and amplification was performed using the Pfu ultra polymerase (Aligent, 600380). The PCR product was digested with DpnI and transformed in *E. coli* XL1-Blue competent cells. Plasmids were then extracted and sequenced (Eurofins Genomics) to validate the presence of the mutation. The pLew100GFP-TbPat^{S68A} plasmid was then transfected in the Δ TbPat cell line.

Western-blot

Total protein extracts from $5 \cdot 10^6$ parasites were separated by SDS-PAGE (10% Mini PROTEAN TGX stain-free precast gradient gels, Bio-Rad) and blotted on TransBlot Turbo Midi-size PVDF Membranes (Bio-Rad). Membranes were blocked with PBS-0.05% Tween20 containing 5% of skimmed milk powder. Primary and secondary antibodies were diluted in PBS-Tween-Milk as summarized in supplemental Table S2. Secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase allowed revelation using the Clarity Western Enhanced-Chemiluminescence Substrate (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Images were acquired with the ImageQuant Las 4000 imager (GE Healthcare) and processed with ImageJ.

Mass spectrometry and data analysis

$1 \cdot 10^8$ parasites/replicate were washed in their culture medium without serum. Pellets were then resuspended in 200 μ L of a lysis solution prepared extemporaneously and cooled to 4°C containing 4% of sodium deoxycholate in 100 mM Tris-HCl pH 8 and a protease inhibitor cocktail. Solutions were warmed to 95°C for 5 minutes and sonicated at 4°C for 5 cycles of 30 seconds at maximum output. Protein samples were solubilized in Laemmli buffer and 5 μ g of proteins were deposited onto SDS-PAGE gel. After colloidal blue staining, each lane was cut out from the gel and was subsequently cut in 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% ACN, rinsed twice in ultrapure water and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were dried at room temperature, covered with the trypsin solution (10 ng/ μ l in 50 mM NH_4HCO_3), rehydrated at 4 °C for 10 min, and finally incubated overnight at 37 °C. Spots were then incubated for 15 min in 50 mM NH_4HCO_3 at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected, and an $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{HCOOH}$ (47.5:47.5:5) extraction solution was added onto gel slices for 15 min.

The extraction step was repeated twice. Supernatants were pooled and dried in a vacuum centrifuge. Digests were finally solubilized in 0.1% HCOOH. Peptide mixture was analyzed on a Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex, Amsterdam, The Netherlands) coupled to a Electrospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Peptide digests were loaded onto a 300- μ m-inner diameter x 5-mm C₁₈ PepMap™ trap column (LC Packings) at a flow rate of 10 μ L/min and were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 60-cm C18 column (IonOpticks) with a 4–40% linear gradient of solvent B in 48 min (solvent A was 0.1% formic acid and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 200 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 2-kV needle voltage. Data were acquired using Xcalibur 4.4 software in a data-independent mode. A duty cycle alternated one full scan (resolution 60,000, AGC target 4E5, maximum injection time 50 ms, 350–1400 m/z) with 35 DIA MS/MS scans (resolution 30,000, AGC target 5e5, maximum injection time 54 ms) covering the mass range 380–980 with a variable width isolation window. HCD collision energy was set to 25%. DIA data were searched by Chimerys through Proteome Discoverer 3.1 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against the TriTrypDB *Trypanosoma brucei* protein database (strain 927 - 9243 entries). Spectra from peptides higher than 5000 Da or lower than 350 Da were rejected. Maximum fragment tolerance was set at 20 ppm. Two missed trypsin cleavages were allowed. Oxidation of methionines (+16 Da) was considered as variable modifications while carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) was considered as fixed modification. Only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level. Peptide quantitation was achieved using the Fragment ions Quantifier node. Normalization was performed based on total trypanosoma peptide amount. Protein ratio were calculated as the median of all possible pairwise peptide ratios. A t-test was calculated based on background population of peptides or proteins and was adjusted using the Benjamini-Hochberg correction⁴⁷. To analyze for differential abundance of proteins in Δ TbPat cell lines compared to wild-type parasites, proteins were filtered based on several criteria: i) the protein is a master protein, ii) it has at least two unique peptides, iii) it is present in all replicates of both conditions or completely absent in one of the condition and iv) the mean abundance of the protein is superior to 1.10^5 in at least one condition. Further analysis of selected proteins and graphical representation were done using R version 4.4.1 with the ggplot2 and ggrepel packages.

Protein names and GO Terms were identified with TriTrypDB and manually changed to regroup proteins with the same GO slim using the QuickGo tool (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/help/slms>). Localization of each protein was verified on TrypTag³⁴.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using Prism (GraphPad) software. Results are presented as mean \pm standard deviation. To get the mean number of lipid droplets per parasite, 100 parasites/condition were manually analyzed. To quantify the lipid droplet area, 100 droplets were analyzed for each condition. Results were subjected to either Student's t-test (comparison of two groups) or one-way ANOVA (comparison of four groups) to determine statistical differences between groups. p-value (confidence interval of 95%) is indicated as ns (not significant), ** (0.0021), **** (<0.0001).

Contributions

P.H conceived the study, performed experiments, contributed to analysis, acquired funding and wrote the manuscript with input from all the authors. Y.Y.C performed lipidomic experiments and contributed to analysis. S.C performed proteomic experiments and contributed to analysis. C.B conceived the study and contributed to analysis. F.B and E.T contributed to analysis. L.R conceived the study, performed experiments, contributed to analysis and acquired funding.

References

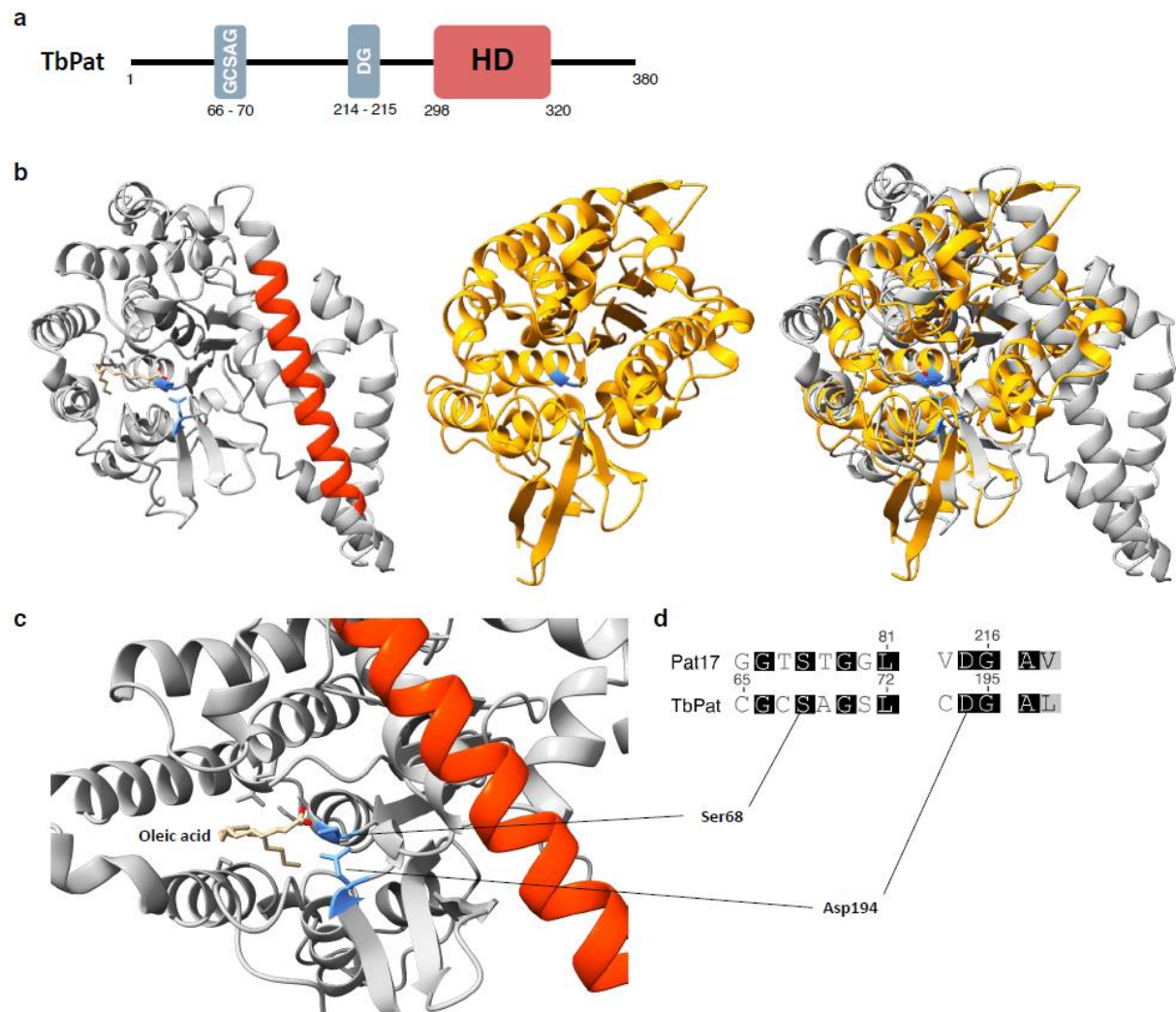
1. Büscher, P., Cecchi, G., Jamonneau, V. & Priotto, G. Human African trypanosomiasis. *The Lancet* **390**, 2397–2409 (2017).
2. Bringaud, F., Rivière, L. & Coustou, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* **149**, 1–9 (2006).
3. Poudyal, N. R. & Paul, K. S. Fatty acid uptake in *Trypanosoma brucei*: Host resources and possible mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol* **12**, 949409 (2022).
4. Paul, K. S., Jiang, D., Morita, Y. S. & Englund, P. T. Fatty acid synthesis in African trypanosomes: a solution to the myristate mystery. *Trends Parasitol* **17**, 381–387 (2001).
5. Coppens, I. & Courtoy, P. J. The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. *Annu Rev Microbiol* **54**, 129–156 (2000).

6. Gillett, M. P. & Owen, J. S. Characteristics of the binding of human and bovine high-density lipoproteins by bloodstream forms of the African trypanosome, *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochim Biophys Acta* **1123**, 239–248 (1992).
7. Rivière, 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).
8. Mazet, M. *et al.* Revisiting the Central Metabolism of the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the Mitochondrion Is Essential for Parasite Viability. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2587 (2013).
9. Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriel, A. & Abousalham, A. Phospholipases: An Overview: Methods and Protocols. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1835 69–105 (2018).
10. Hervé, P., Monic, S., Bringaud, F. & Rivière, L. Phospholipases A and Lysophospholipases in protozoan parasites. *Microb Cell* **10**, 204–216 (2023).
11. Wilson, S. K. & Knoll, L. J. Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa: Apicomplexa patatin-like phospholipases. *Molecular Microbiology* **107**, 34–46 (2018).
12. Lulić, A.-M. & Katalinić, M. The PNPLA family of enzymes: characterisation and biological role. *Arh Hig Rada Toksikol* **74**, 75–89 (2023).
13. Henne, W. M. The (social) lives, deaths, and biophysical phases of lipid droplets. *Current Opinion in Cell Biology* **82**, 102178 (2023).
14. Herker, E., Vieyres, G., Beller, M., Krahmer, N. & Bohnert, M. Lipid Droplet Contact Sites in Health and Disease. *Trends Cell Biol* **31**, 345–358 (2021).
15. Jin, Y., Tan, Y., Wu, J. & Ren, Z. Lipid droplets: a cellular organelle vital in cancer cells. *Cell Death Discov* **9**, 254 (2023).
16. Melo, R. C. N. *et al.* Lipid Bodies in Inflammatory Cells. *J Histochem Cytochem* **59**, 540–556 (2011).
17. Liao, P.-C. *et al.* Touch and Go: Membrane Contact Sites Between Lipid Droplets and Other Organelles. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **10**, (2022).
18. Maestri, A. *et al.* Lipid droplets, autophagy, and ageing: a cell-specific tale. *Ageing Res Rev* 102194 (2024) doi:10.1016/j.arr.2024.102194.
19. Zechner, R., Madeo, F. & Kratky, D. Cytosolic lipolysis and lipophagy: two sides of the same coin. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 671–684 (2017).
20. Asad, M. *et al.* An essential vesicular-trafficking phospholipase mediates neutral lipid synthesis and contributes to hemozoin formation in *Plasmodium falciparum*. *BMC Biol* **19**, 159 (2021).
21. Vielemeyer, O., McIntosh, M. T., Joiner, K. A. & Coppens, I. Neutral lipid synthesis and storage in the intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **135**, 197–209 (2004).

22. Lee, J., Matuschewski, K., van Dooren, G., Maier, A. G. & Rug, M. Lipid droplet dynamics are essential for the development of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Journal of cell science* (2024) doi:10.1242/jcs.262162.
23. Quittnat, F. *et al.* On the biogenesis of lipid bodies in ancient eukaryotes: synthesis of triacylglycerols by a *Toxoplasma* DGAT1-related enzyme. *Mol Biochem Parasitol* **138**, 107–122 (2004).
24. Gomes, A. F. *et al.* *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN- γ and PGE2. *Parasites & Vectors* **7**, 47 (2014).
25. Dass, S. *et al.* *Toxoplasma* LIPIN is essential in channeling host lipid fluxes through membrane biogenesis and lipid storage. *Nat Commun* **12**, 2813 (2021).
26. Rabhi, S. *et al.* Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *PLoS One* **11**, e0148640 (2016).
27. Araújo-Santos, T. *et al.* Role of Prostaglandin F $_{2\alpha}$ Production in Lipid Bodies From *Leishmania infantum* chagasi: Insights on Virulence. *J Infect Dis* **210**, 1951–1961 (2014).
28. Toledo, D. A. M. *et al.* Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism. *PLoS One* **11**, e0160433 (2016).
29. Flaspohler, J. A., Jensen, B. C., Saveria, T., Kifer, C. T. & Parsons, M. A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes. *Eukaryot Cell* **9**, 1702–1710 (2010).
30. Dawoody Nejad, L., Serricchio, M., Jelk, J., Hemphill, A. & Bütikofer, P. Tblpn, a key enzyme in lipid droplet formation and phospholipid metabolism, is essential for mitochondrial integrity and growth of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* (2018) doi:10.1111/mmi.13976.
31. Billington, K. *et al.* Genome-wide subcellular protein map for the flagellate parasite *Trypanosoma brucei*. *Nat Microbiol* (2023) doi:10.1038/s41564-022-01295-6.
32. Abramson, J. *et al.* Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature* **630**, 493–500 (2024).
33. Wijeyesakere, S. J., Richardson, R. J. & Stuckey, J. A. Crystal structure of patatin-17 in complex with aged and non-aged organophosphorus compounds. *PLoS One* **9**, e108245 (2014).
34. Billington, K. *et al.* Genome-wide subcellular protein map for the flagellate parasite *Trypanosoma brucei*. *Nat Microbiol* (2023) doi:10.1038/s41564-022-01295-6.
35. Kory, N., Farese, R. V. & Walther, T. C. Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets. *Trends Cell Biol* **26**, 535–546 (2016).
36. Asencio, C. *et al.* *Streptococcus pyogenes* Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Mol Microbiol* **121**, 1079–1094 (2024).
37. Allmann, S. *et al.* Triacylglycerol Storage in Lipid Droplets in Procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS One* **9**, e114628 (2014).

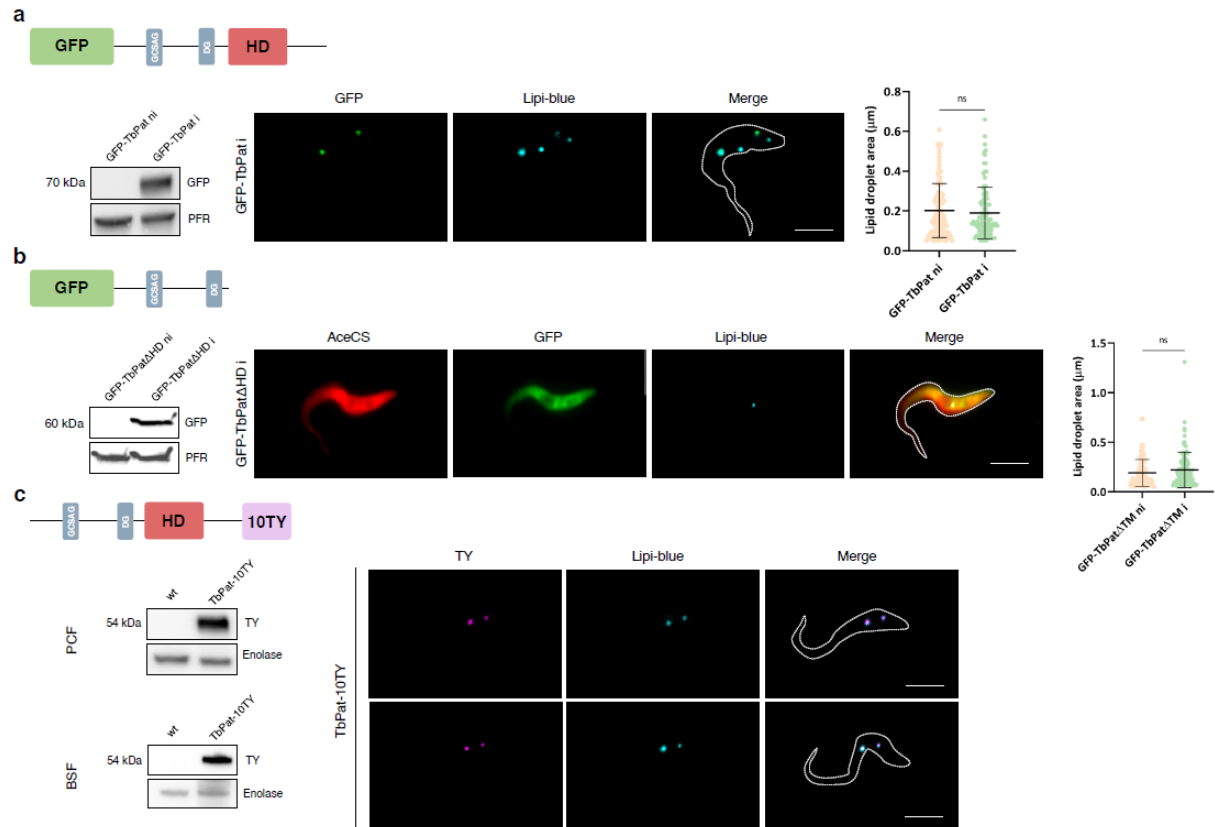
38. Machado, H., Hofer, P., Zechner, R., Smith, T. K. & Figueiredo, L. M. Adipocyte lipolysis protects mice against *Trypanosoma brucei* infection. *Nat Microbiol* (2023) doi:10.1038/s41564-023-01496-7.
39. Zíková, A. Mitochondrial adaptations throughout the *Trypanosoma brucei* life cycle. *J Eukaryot Microbiol* **69**, e12911 (2022).
40. Zhang, Z. *et al.* Roles of lipid droplets and related proteins in metabolic diseases. *Lipids Health Dis* **23**, 218 (2024).
41. Welte, M. A. Expanding roles for lipid droplets. *Curr Biol* **25**, R470-481 (2015).
42. Bosch, M., Sweet, M. J., Parton, R. G. & Pol, A. Lipid droplets and the host-pathogen dynamic: FATal attraction? *J Cell Biol* **220**, e202104005 (2021).
43. Lee, S. H., Stephens, J. L., Paul, K. S. & Englund, P. T. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. *Cell* **126**, 691–699 (2006).
44. Smirnova, E. *et al.* ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep* **7**, 106–113 (2006).
45. Schuldiner, M. & Bohnert, M. A different kind of love – lipid droplet contact sites. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 1188–1196 (2017).
46. Allmann, S. & Bringaud, F. Glycosomes: A comprehensive view of their metabolic roles in *T. brucei*. *Int J Biochem Cell Biol* **85**, 85–90 (2017).
47. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat Methods* **4**, 923–925 (2007).

Fig. 1: Tb927.4.1780 encodes for a patatin-like phospholipase



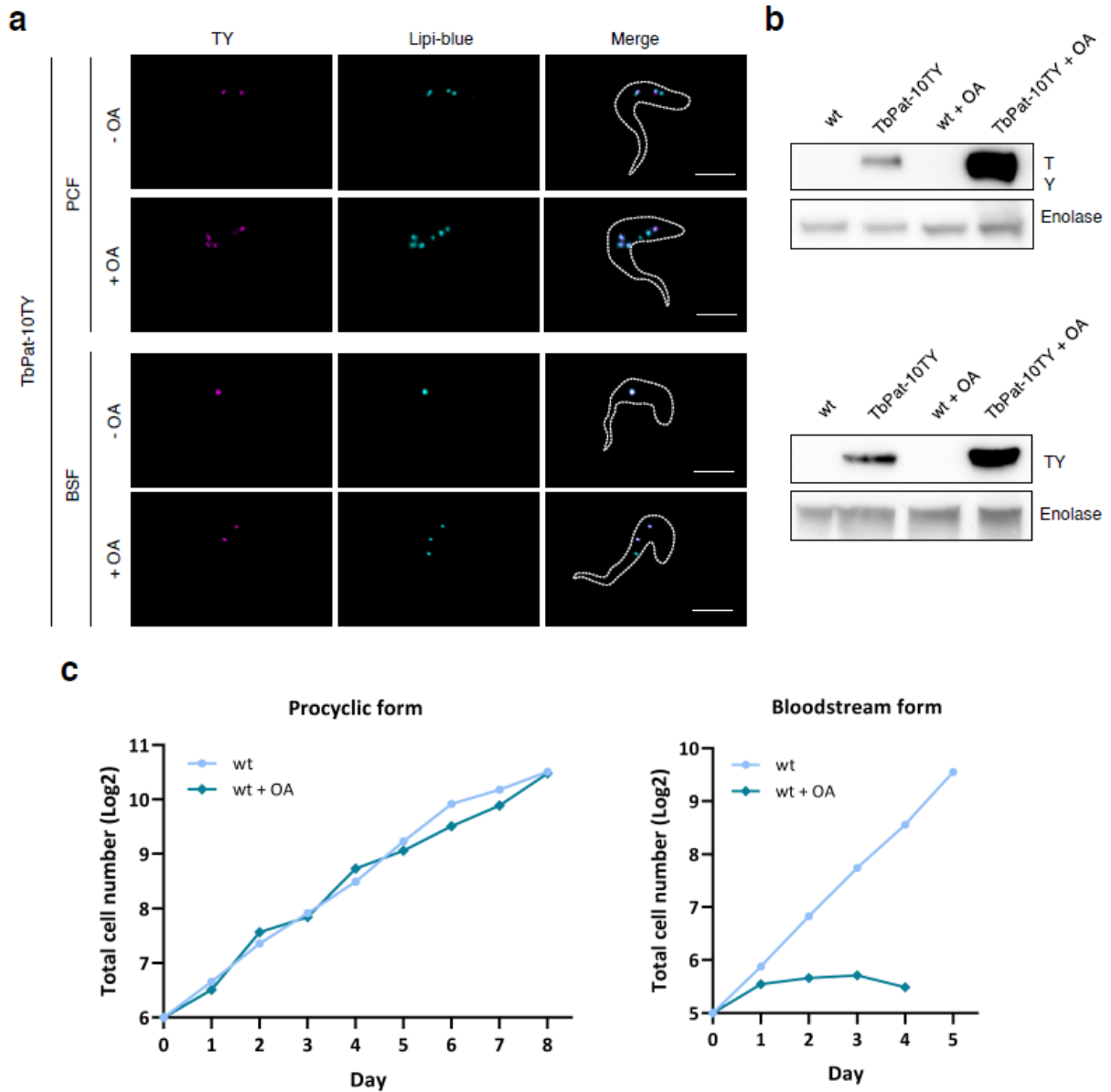
a, Schematic representation of the structure of TbPat. Residues surrounding regions of interest (putative catalytic site, hydrophobic region) are annotated. HD, hydrophobic domain. **b**, AlphaFold3 models of the structure of TbPat with oleic acid and Pat17 (yellow, center) and superposition of their structure (right) **c**, zoom on the putative catalytic dyad (Serine 68 and Aspartate 194, blue) of TbPat (**c**). The hydrophobic domain of TbPat is highlighted in red and the active residue of both enzymes are highlighted in blue. **d**, Sequence alignment of the catalytic dyad of Pat17 and TbPat. Consensus amino acids are highlighted in black.

Fig. 2: TbPat localizes to lipid droplets through its hydrophobic domain.



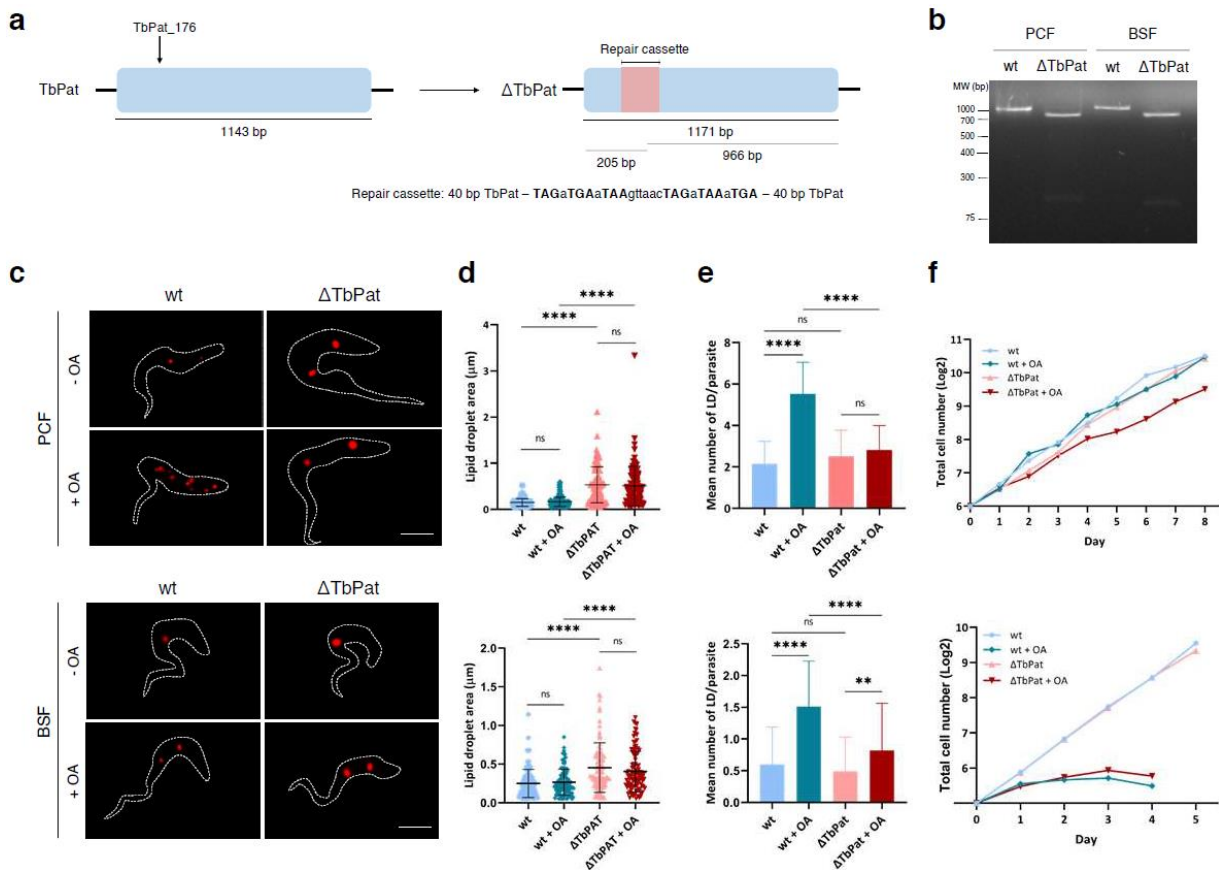
a, Overexpression of GFP-TbPat. Schematic representation of the TbPat sequence fused to a GFP at its N-terminus on the pLew100 expression plasmid, transfected in wild-type procyclic *T. brucei* parasites (top left). Western-blot (left) and immunofluorescence (center) of procyclic parasites expressing the GFP-TbPat fusion protein. Quantification of the area of lipid droplets in non-induced or induced procyclic GFP-TbPat parasites (right). **b**, Overexpression of GFP-TbPat Δ HD. Schematic representation of the TbPat Δ HD sequence fused to a GFP at its N-terminus on the pLew100 expression plasmid (top left). Western-blot (left) and immunofluorescence (center) of parasites expressing the GFP-TbPat Δ HD fusion protein. Quantification of the area of lipid droplets in non-induced or induced GFP-TbPat Δ HD parasites (right). **c**, Expression of TbPat-10TY. Schematic representation of TbPat endogenously tagged at its C-terminus extremity with 10TY in both alleles (top left). Western-Blot (left) and immunofluorescence (right) of procyclic (PCF) and bloodstream (BSF) TbPat-10TY parasites. Scale bars for all images, 5 μ m. The graphical data in **a** and **b** are presented as means + sd. ns, not significant. Lipid droplet area was counted using a macro developed for ImageJ. Statistical significance was determined by Student's t-test with a confidence interval of 95%. n = 100 lipid droplets/condition. Graphs were generated using GraphPad Prism version 8.0.2.

Fig. 3: TbPat expression increases after oleate-induced lipid droplet formation.



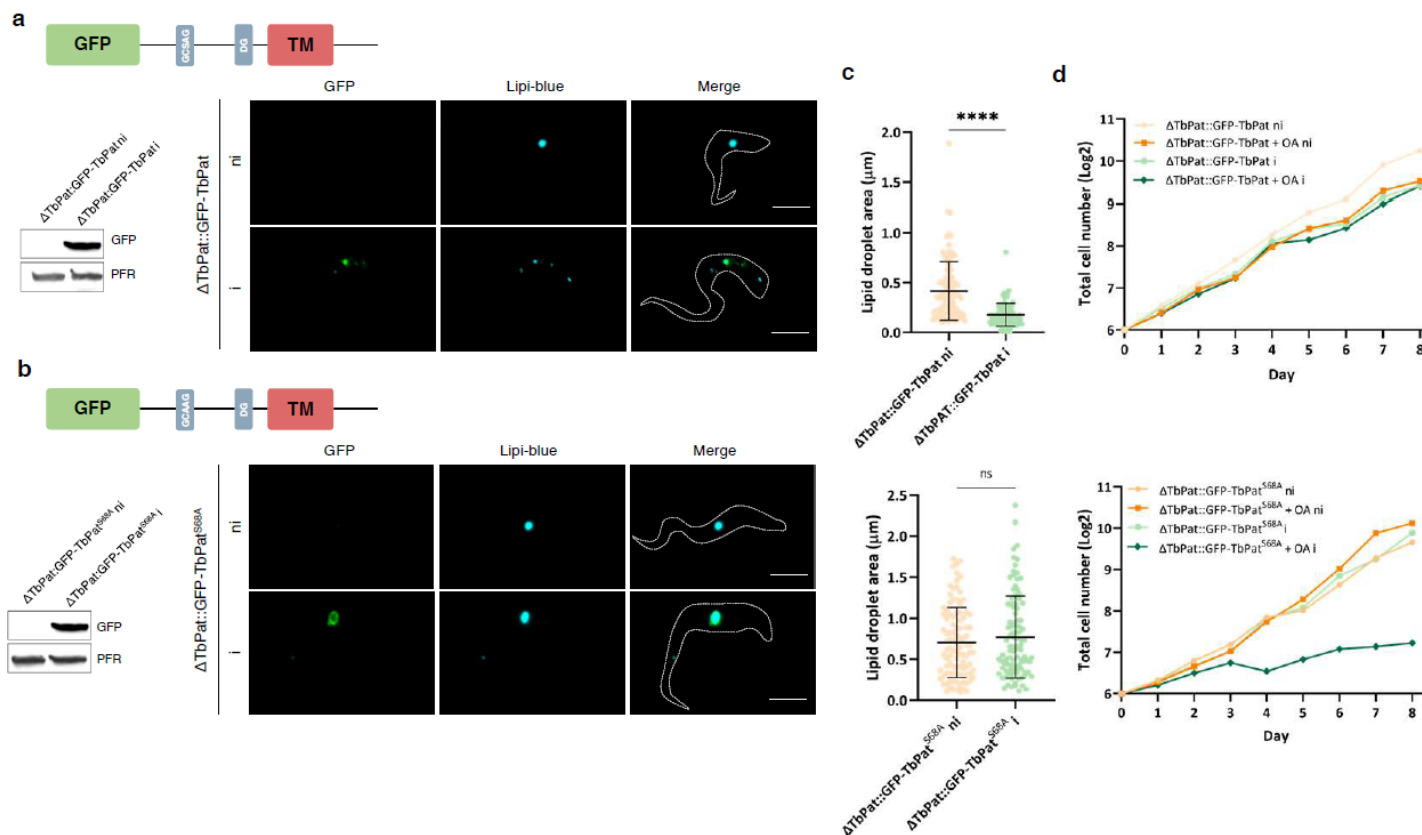
a. Immunofluorescence of procyclic (PCF) and bloodstream (BSF) TbPat-10TY parasites before and after incubation with 400 μ M oleate for 24 hours. Scale bars, 5 μ m. **b.** Western-blot of wild-type and TbPat-10TY PCF and BSF parasites with or without oleate treatment for 24 hours. **c.** Growth curves of PCF and BSF parasites with or without oleate supplementation. Oleate was added at every dilution of the pool of parasites. Growth curves were made in triplicates and averaged. Graphs were generated using GraphPad Prism version 8.0.2.

Fig. 4: Loss of TbPat significantly impacts lipid droplet size and generation



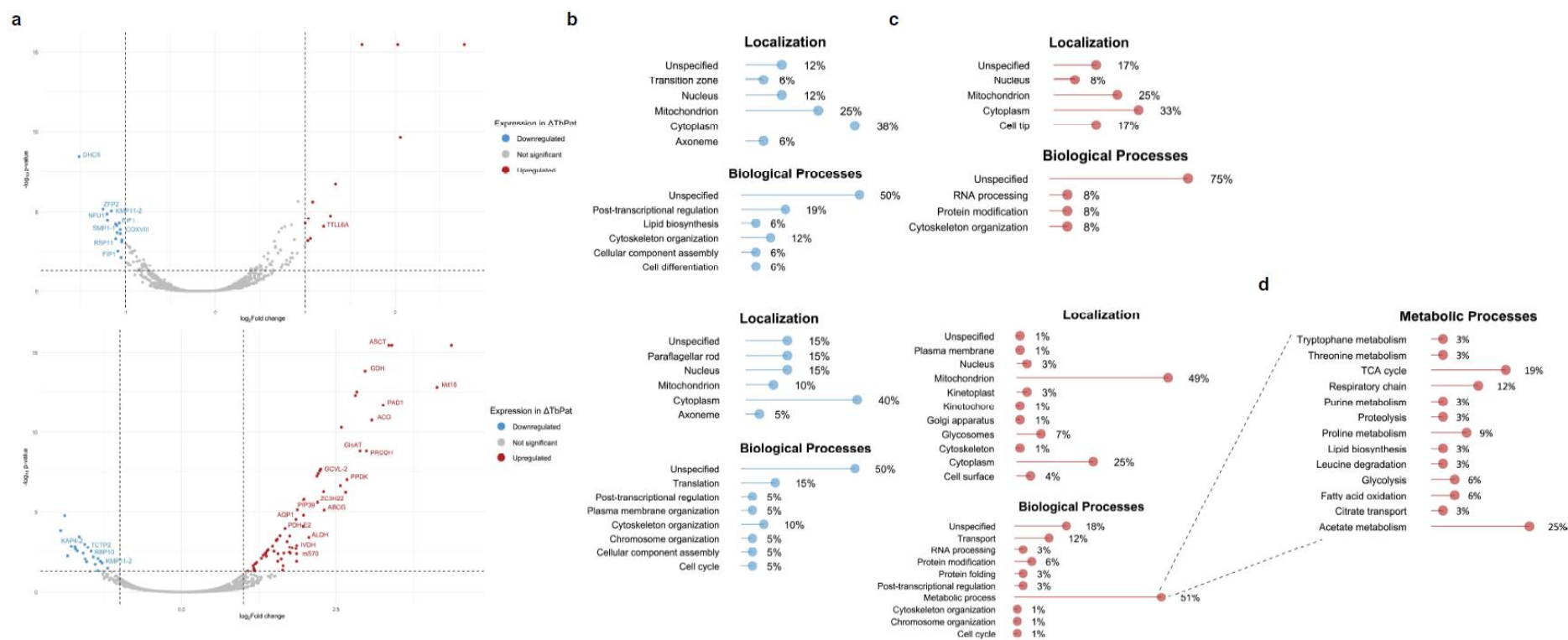
a, Schematic representation of the TbPat locus (blue square) and the inactivation strategy by insertion of a short sequence containing a succession of STOP codons surrounding the HpaI restriction site flanked by around 40 bp homologous to the 5' and 3' of TbPat. The position of the guide (TbPat_176) is indicated by a vertical arrow and the repair cassette is represented by a pink square inside the TbPat sequence. **b**, PCR amplification and digestion by HpaI of the TbPat genomic sequence in wild-type and a Δ TbPat clone in procyclic and bloodstream forms. **c**, Immunofluorescence of procyclic (top) and bloodstream (bottom) wild-type and Δ TbPat parasites with or without oleate feeding for 24 hours. **d**, Quantification of the area of lipid droplets in wild-type and Δ TbPat procyclic (top) and bloodstream (bottom) parasites with or without oleate supplementation. **e**, Quantification of the mean number of lipid droplets/parasite in wild-type and Δ TbPat procyclic (top) and bloodstream (bottom) parasites with or without oleate supplementation. **f**, Growth curves of wild-type and Δ TbPat parasites with or without oleate feeding. Oleate was added at every dilution of the pool of parasites. Scale bars for all images, 5 μ m. The data in **d** and **e** are presented as means + sd. ns, not significant; **, 0.0022; ****, <0.0001. Lipid droplet area was counted using a macro developed for ImageJ. The number of lipid droplets/parasite was counted manually. Statistical significance was determined by one-way ANOVA with a confidence interval of 95%. n = 100 lipid droplets/condition or 100 parasites/condition. OA, oleate. Graphs were generated using GraphPad Prism version 8.0.

Fig. 5: TbPat active site serine is essential for enzymatic activity



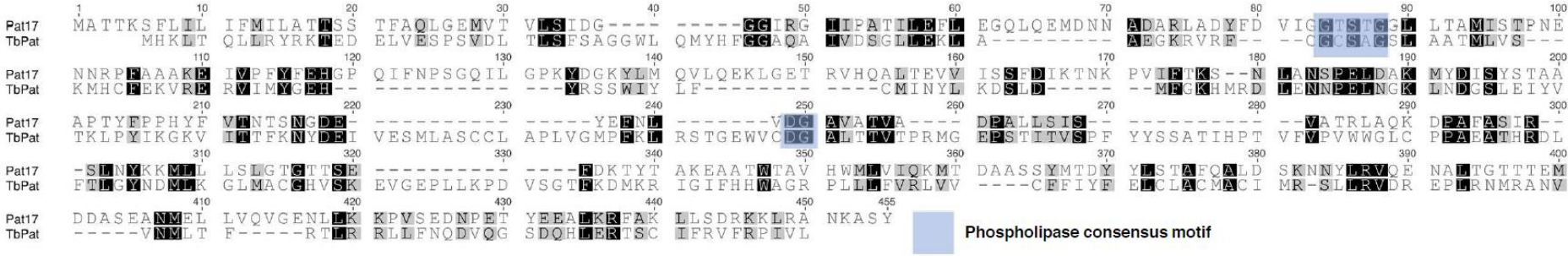
a. Expression of GFP-TbPat in Δ TbPat parasites. Schematic representation of the GFP-TbPat fusion sequence on the pLew100 expression plasmid, transfected in Δ TbPat *T. brucei* (top left). Western-blot (left) and immunofluorescence (right) of procyclic non-induced or induced Δ TbPat::GFP-TbPat parasites **b.** Expression of GFP-TbPat^{S68A} in Δ TbPat parasites. Schematic representation of the GFP-TbPat^{S68A} fusion sequence on the pLew100 expression plasmid, transfected in Δ TbPat *T. brucei* (top left). Western-blot (left) and immunofluorescence (right) of procyclic non-induced or induced Δ TbPat::GFP-TbPat^{S68A} parasites. **c.** Quantification of the area of lipid droplets in non-induced and induced Δ TbPat::GFP-TbPat (top) and Δ TbPat::GFP-TbPat^{S68A} (bottom). The area was measured after 24 hours of induction. **d.** Growth curves of non-induced and induced Δ TbPat::GFP-TbPat (top) and Δ TbPat::GFP-TbPat^{S68A} (bottom) parasites with or without oleate feeding. Scale bars for all images, 5 μ m. The data in **c** is presented as means + sd. ns, not significant; ****, <0.0001. Lipid droplet area was counted using a macro developed for ImageJ. Statistical significance was determined by Student's t-test with a confidence interval of 95%. n = 100 lipid droplets/condition. OA, oleate; ni, non-induced; i, induced. Graphs were generated using GraphPad Prism version 8.0.2.

Fig. 6: Deletion of TbPat leads to a remodeling of the metabolic proteome of bloodstream T. brucei



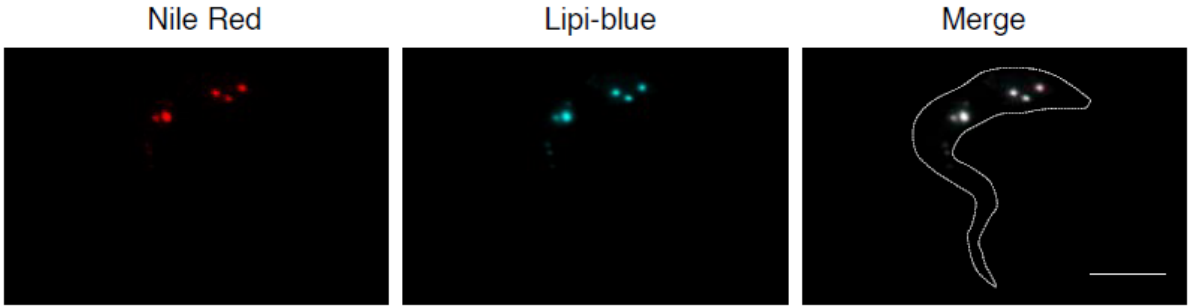
a, Volcano-Plot depicting differently expressed genes in Δ TbPat procyclic (top) and bloodstream (bottom) parasites compared to wild-type cells **b**, Lollipop plot of the localization and biological processes of downregulated proteins in Δ TbPat procyclic (top) and bloodstream (bottom) parasites. **c**, Lollipop plot of the localization and biological processes of upregulated proteins in Δ TbPat procyclic (top) and bloodstream (bottom) parasites. **d**, Lollipop plot of the specific metabolic processes of upregulated proteins in Δ TbPat bloodstream parasites. The data in **b**, **c** and **d** are presented as percentage of proteins with the same localization/process over the total number of localizations/processes identified inside the group. Localization for each protein was searched on TrypTag. Biological processes were manually grouped based on pre-existing GO terms. For **d**, metabolic processes were applied based on each protein's known activity. Graphs were generated using R version 4.4.1.

Fig. S1: Protein sequence alignment between TbPat and Pat17.



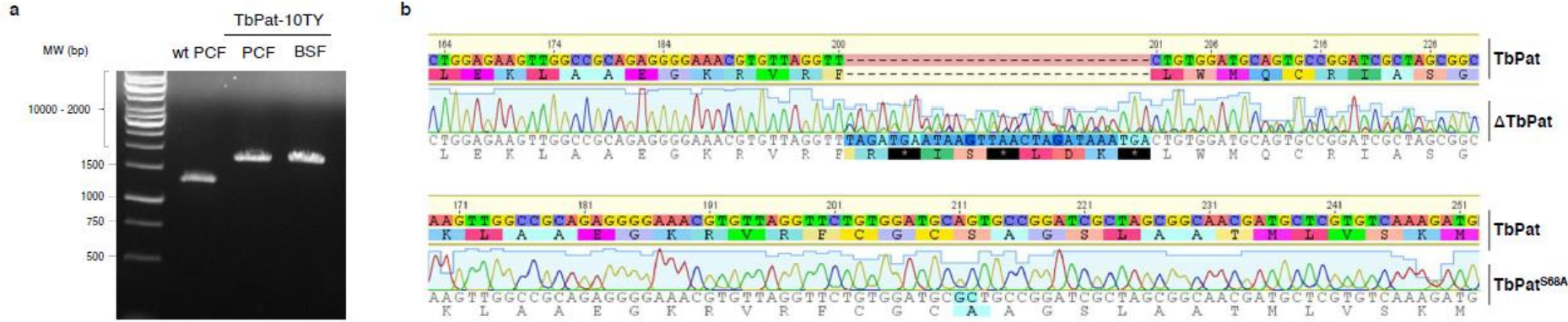
MUSCLE alignment of TbPat (Tb927.4.1780) and Pat17 (NCBI Accession number AAK56395.1). The consensus motifs containing the active residues are highlighted in blue.

Fig. S2: Colocalization of Nile Red and Lipi-blue.



Lipid droplet co-staining in procyclic wild-type parasites. Scale bar, 5 μ m.

Fig. S3: Insertion of the 10TY tag and sequencing of Δ TbPat and TbPat^{S68A}



a, PCR amplification of wild-type TbPat from PCF EATRO parasites and TbPAT-10TY of PCF and BSF parasites. **b**, Alignment of Δ TbPat (top) or TbPat^{S68A} (bottom) with the wild-type TbPat sequence. The alignment only shows the region of interest for each sequence.

Fig. S4: ImageJ script used for lipid droplet area quantification.

```
run("Duplicate...", "title=Comptage.TIF");

Dialog.create("Objective choice");
Dialog.addChoice("Microscope objective", newArray("63x", "100x"));
Dialog.show();
choixObjectif = Dialog.getChoice();
if (choixObjectif == "63x") {
    run("Set Scale...", "distance=9.76753 known=1 unit=µm");
} else if (choixObjectif == "100x") {
    run("Set Scale...", "distance=15.50387 known=1 unit=µm");
}
run("Threshold...");
waitForUser("1-Modify the threshold to highlight the tryps area\n2-Press apply \n3-Once done, click Ok");
run("Threshold...");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Set Measurements...", "area mean centroid perimeter shape display add redirect=None decimal=3");
```

Table S1: primers and guide RNA used

Name	Sequence	Used for
Primers		
PH_35	CTTTGGTGATGCATAAGCTGA	TbPat amplification
PH_2	GATATATGATGTTCTCTATGC	
TbPATGFP5p	AGCATATGATGCATAAGCTGACTCAGCTTCTG	GFP-TbPat
TbPATGFP3p	AGCTCGAGCTATTCCGCCACCTCCTTTG	
TbPATGFP5p	AGCATATGATGCATAAGCTGACTCAGCTTCTG	GFP-TbPat Δ HD
PH_5	GCTCTAGATTACAGAAGAGGTCGACC	
PH_80	GTGCAGGGGAGCGATCAGCACCTCGAGAGGACCTCGTGTATTTTT CGCGTATTTAGGCCCATAGTTTTATCTAGAGAGGTACACACAAAC	10TY tag cassette
PH_81	GGTCTGAAGACCCGGAATATGCGGATCCTCAATCAAGAGGATCTT GGTTCGT	
KO-TbPat_FW	GGGTTGCTGGAGAAGCTGGCTGCAGAGGGGAAACGTGTTAGGTTT AGATGAATAAGTTAACTAGATAAATGACTGTGGAT	Δ TbPat cassette
KO-TbPat_RV	CGAGCATCGTTGCCGCTAGCGATCCGGCACTGCATCCACAGTCAT TTATCTAGTTAACTTATTCATCTAACCTAACACG	
PATMD5p	CTGTGGATGCGCTGCCGGATCGC	S68A directed mutagenesis
PATMD3p	CGCATCCGGCAGCGCATCCACAG	
Guide RNA (PAM)		
TbPat_1125_revcom	GAAGACCCGGAATATGCACG (AGG)	TbPat-10TY
TbPat_176	GGGAAACGTGTTAGGTTCT (TGG)	Δ TbPat

PAM, proto-adjacent spacer motif.

Table S2: Antibodies used.

IF, immunofluorescence ; WB, western-blot

Antibody name	Species	Dilution	Reference
Primary antibodies			
Anti-Ty1	Mouse	WB 1:500	iMET lab
		IF 1:250	
Anti-Enolase	Rabbit	WB 1:100000	Gift from P. Michels, Edinburgh
		IF 1:2000	
Anti-GFP	Rabbit	WB 1:2000	Abcam
Anti-AceCS	Mouse	WB 1:100	iMET lab
Anti-PFR	Mouse	WB 1:1000	MFP lab
Secondary antibodies			
Anti-mouse Alexa Fluor 488	Donkey	IF 1:400	ThermoFisher
Anti-rabbit Alexa Fluor 594	Goat	IF 1:400	ThermoFisher
Anti-mouse HRP	Goat	WB 1:5000	Bio-Rad
Anti-rabbit HRP	Goat	WB 1:10000	Bio-Rad

GFP

GFP-TbPat
Clone C9



GFP-TbPat
Clone F7

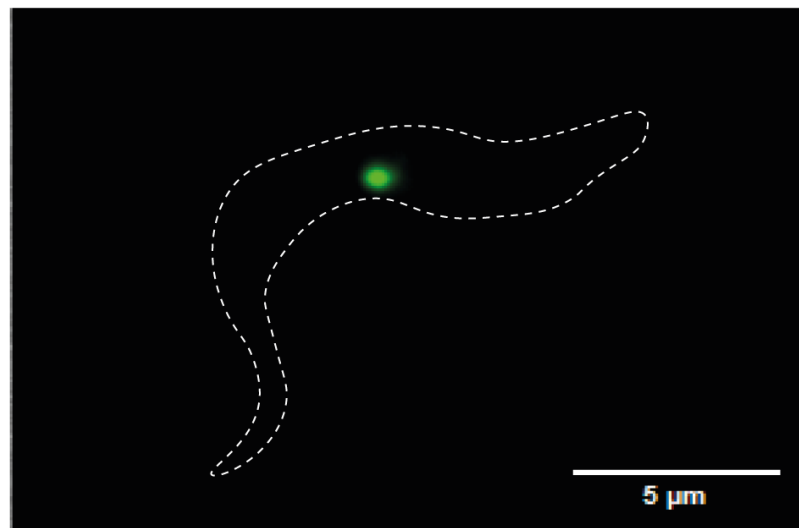


Figure 30: Localisation de GFP-TbPat chez différents clones procycliques.

Des parasites sauvages possédant le système de répression de la tétracycline ont été transfectés avec un plasmide pLew100-GFP-TbPat et dilués pour obtenir des populations clonales. L'induction de la protéine de fusion est faite par ajout de tétracycline dans le milieu de culture. Les immunofluorescences sont réalisées au bout de 24 heures d'induction sur des parasites fixés. La transfection et le clonage ont été réalisés par Loïc Rivière.

3.2.2. TbPat est une protéine ERTOLD

Les protéines localisées à la surface des LD doivent passer par l'une des deux voies d'adressage : CYTOLD, où les protéines traduites dans le cytosol accèdent directement à la surface des LD, ou ERTOLD, voie nécessitant un passage des protéines par le RE pour atteindre la monocouche des LD. De manière générale, les PNPLA semblent utiliser la voie ERTOLD. PNPLA2 et PNPLA3 sont plus précisément amenés à la surface des gouttelettes lipidiques en phase tardive, c'est-à-dire après la formation des LD et leur bourgeonnement à partir de la membrane du réticulum endoplasmique, lors de points de contacts transitoires entre la membrane des LD et du RE (Song et al. 2022).

Plusieurs expériences nous apportent des preuves que TbPat emprunte également la voie ERTOLD. L'induction de la protéine de fusion GFP-TbPat chez les parasites wt montre une double localisation au niveau des LD et du réticulum endoplasmique chez certains clones (Figure 30). Cette double localisation apparaît également chez les parasites Δ TbPat ; la protéine de fusion GFP-TbPat est même presque toujours associée au réticulum endoplasmique. Nous avons initialement transfecté des parasites avec un plasmide contenant une séquence codant pour TbPat-3TY pour faire la complémentation des parasites Δ TbPat, mais cette protéine de fusion était uniquement localisée sur le réticulum endoplasmique chez les parasites wt et Δ TbPat et ne permettait pas la restauration du phénotype sauvage. Le choix de l'étiquette et sa position (N-terminal ou C-terminal de la séquence protéique) influencent ainsi probablement la conformation de la protéine et l'accessibilité aux gouttelettes lipidiques. On retrouve plus rarement cette localisation chez les parasites TbPat-10TY : on observe en immunofluorescence quelques parasites montrent un signal semblant suivre le réticulum endoplasmique, mais la résolution n'est pas assez puissante et le signal est très faible. La rétention de TbPat dans le réticulum endoplasmique pourrait ainsi être une conséquence de la surexpression des protéines de fusion et/ou la présence de l'étiquette qui empêche l'accès direct aux gouttelettes lipidiques.

TbPat apparaît néanmoins comme une protéine ERTOLD, comme c'est le cas pour plusieurs PNPLA humaines associées aux LD (Song et al. 2022).

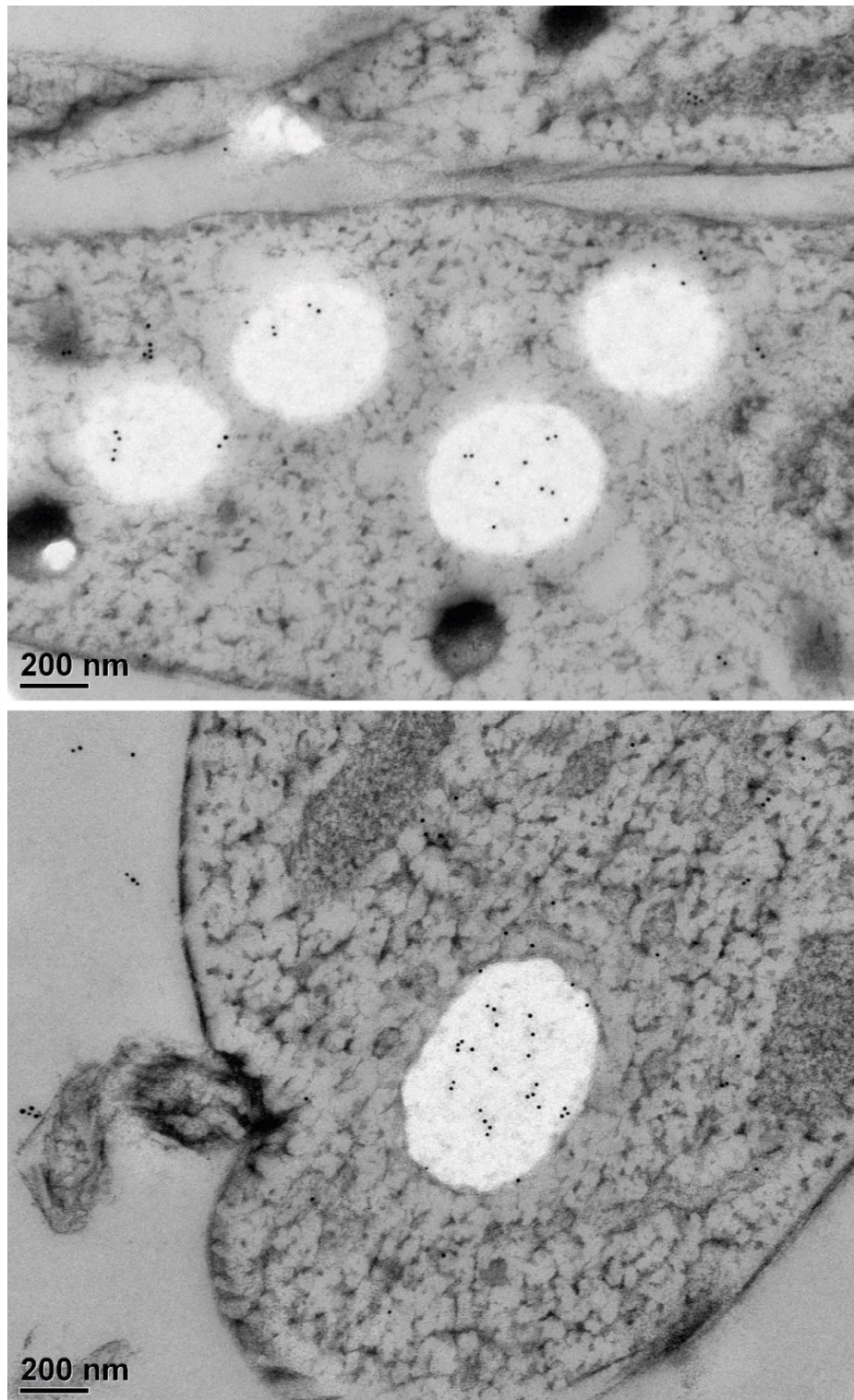


Figure 31: Immunomicroscopie électronique des parasites exprimant GFP-TbPat.

La protéine de fusion GFP-TbPat a été induite pendant 5 jours à la tétracycline avant cryo-fixation suivi d'un marquage de la GFP à l'aide d'un anti-GFP et d'anticorps secondaires couplés à des particules d'or. L'observation a été faite au microscope électronique HITACHI 7650 à la plateforme BIC (Bordeaux Imaging Center). La préparation des parasites induits et non-induits et l'observation ont été réalisées par Corinne Blancard et Bénédicte Salin (Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Bordeaux)

3.2.3. Analyse de la localisation de TbPat par immunomicroscopie électronique

Les expériences d'immunofluorescence sur la souche TbPat-10TY (Article, section 3.2.1.2) montrent que la protéine n'est pas retrouvée à la surface de toutes les LD de *T. brucei*, et n'entoure pas entièrement les gouttelettes ; en effet, on observe plutôt une polarisation du signal, ce qui pourrait potentiellement indiquer que la protéine est retrouvée à l'interface entre les LD et un autre compartiment cellulaire. Pour obtenir une meilleure résolution de la localisation de TbPat sur les gouttelettes lipidiques et rechercher de potentiels zones d'interactions de la protéine avec d'autres organites, plusieurs expériences d'immunomicroscopie électronique (iEM) ont été réalisées. Cependant, nous avons rencontré plusieurs difficultés.

Nous avons tout d'abord tenté d'observer la localisation de la protéine endogène étiquetée avec 10TY (TbPat-10TY) en présence d'oléate pour augmenter le signal de TbPat en utilisant une souche wt comme contrôle négatif, mais le signal apporté était trop faible et s'apparentait à du bruit de fond, bien que l'on puisse observer quelques billes d'or localisées au niveau de la membrane des gouttelettes. Nous avons donc refait cette expérience d'iEM chez la souche exprimant la protéine de fusion GFP-TbPat dont l'expression est induite par la présence de tétracycline, en utilisant comme contrôle négatif des parasites non-induits à la tétracycline. Le désavantage d'utiliser cette souche est que l'expression n'est pas contrôlée par le promoteur endogène et ne représente pas l'expression basale de TbPat, ce qui pourrait empêcher d'observer des interactions spécifiques de la protéine avec d'autres complexes. L'observation des parasites induits montre une localisation très spécifique des billes d'or couplés à l'anticorps anti-GFP au niveau des gouttelettes lipidiques des parasites (Figure 31), mais un signal similaire est visible chez les parasites GFP-TbPat non-induits. Cela pourrait notamment être expliqué par une fuite du promoteur T7, qui est trop faible pour être visible en immunofluorescence classique ou par WB. Pour vérifier cela, l'iEM pourrait être refaite en utilisant la souche wt comme contrôle négatif pour s'assurer de la spécificité de l'anticorps et donc de la localisation de la protéine sur les gouttelettes lipidiques.

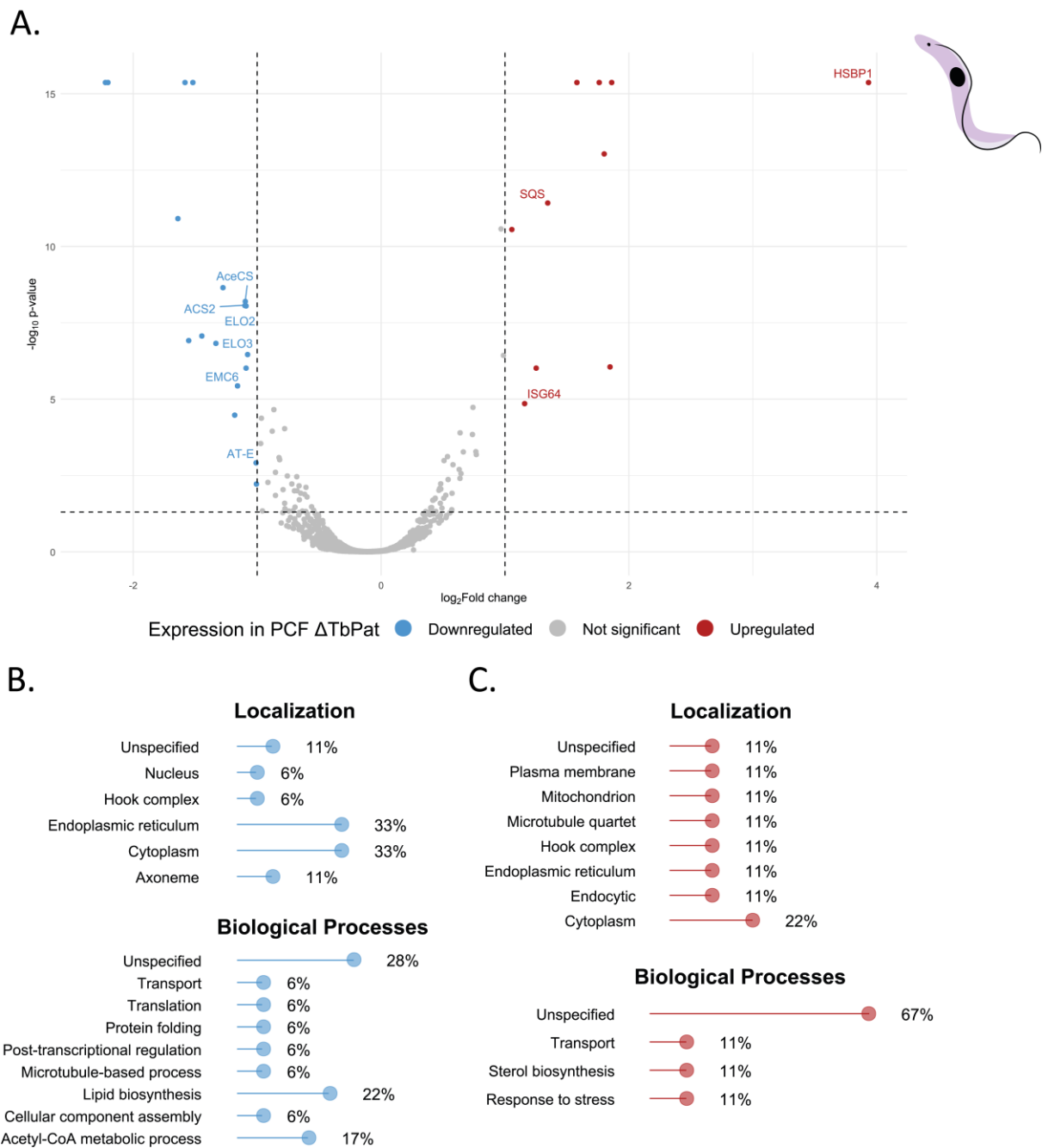


Figure 32: Impact de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme procyclique sauvage.

A. Volcano plot des protéines retrouvées dans le protéome de *T. brucei* forme procyclique sauvage sans ou avec oléate selon les critères détaillés dans la section 2.2.6.2. **B.** et **C.** Lollipop plot des localisations et processus biologiques des protéines dont l'expression diminue (**B.**) ou augmente (**C.**) significativement.

3.2.4. Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de *Trypanosoma brucei*

Pour comprendre plus globalement comment l'ajout d'oléate impacte les différentes formes de *T. brucei*, nous avons réalisé une analyse sur le protéome total des parasites chez la forme procyclique et sanguine. Pour chaque forme, 4 conditions ont été préparées pour analyse par spectrométrie de masse à la plateforme de protéomique de l'Université de Bordeaux : parasites sauvages sans ou avec oléate et parasites Δ TbPat sans ou avec oléate. Les données reportées ici ont été sélectionnées selon plusieurs critères (voir section 2.2.6.2). Les données de protéomique montrant l'effet de la délétion de Δ TbPat chez les formes procycliques et sanguines sont présentées dans l'article ; cette partie des résultats montre les données concernant l'ajout d'oléate chez les parasites sauvages et Δ TbPat. A noter que TbPat n'apparaît pas dans l'analyse des parasites sauvages car la protéine n'a pas été détectée par spectrométrie de masse, même dans les conditions avec oléate. A notre connaissance, la protéine n'a jamais été détectée lors des analyses sur le protéome de *T. brucei*. TbPat pourrait être résistante à la digestion des protéines en peptides par la trypsine, réalisée avant l'analyse du protéome par spectrométrie, ou elle n'est pas assez abondante pour atteindre le seuil de détection, même en conditions avec oléate.

3.2.4.1. Chez les parasites sauvages

Les formes procycliques et sanguines ayant une morphologie, un métabolisme et un protéome différent, il n'est pas étonnant de voir que différents types de protéines réagissent à l'ajout d'oléate (Figures 32 et 33). Ainsi, chez la forme procyclique, on retrouve une diminution significative des protéines ELO2 et ELO3 (Figure 32A), élongases des acides gras impliquée dans la production d'acides gras. Il a déjà été observé que la voie ELO de *T. brucei* est régulée selon les besoins des cellules et la présence d'acides gras dans le milieu de culture ; l'expression d'ELO3 diminue notamment en présence d'acide gras exogènes chez les formes sanguines (Lee et al. 2006). On observe également une diminution de l'acyl-CoA synthétase ACS2. *T. brucei* possède 5 acyl-CoA synthétases annotées de ACS1 à 5 ; ACS2 est la seule synthétase dont l'expression est modifiée en présence d'oléate. Cette enzyme est uniquement active sur des acides gras saturés courts (C6 à 12) (Jiang et Englund 2001) ; son expression pourrait diminuer car elle n'est pas nécessaire à la métabolisation de l'oléate, un acide gras monoinsaturé et long (C18:1).

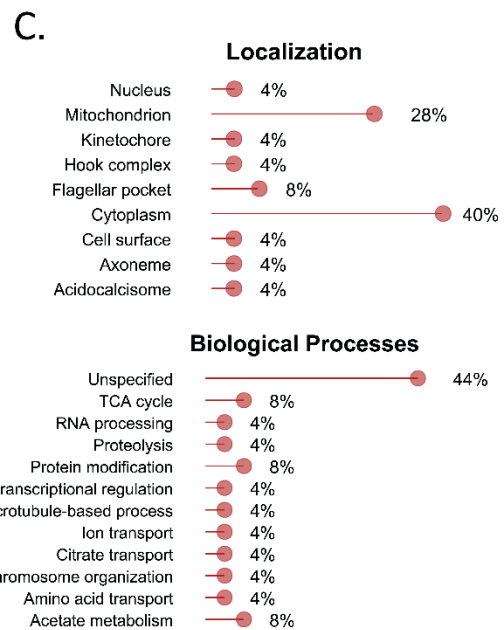
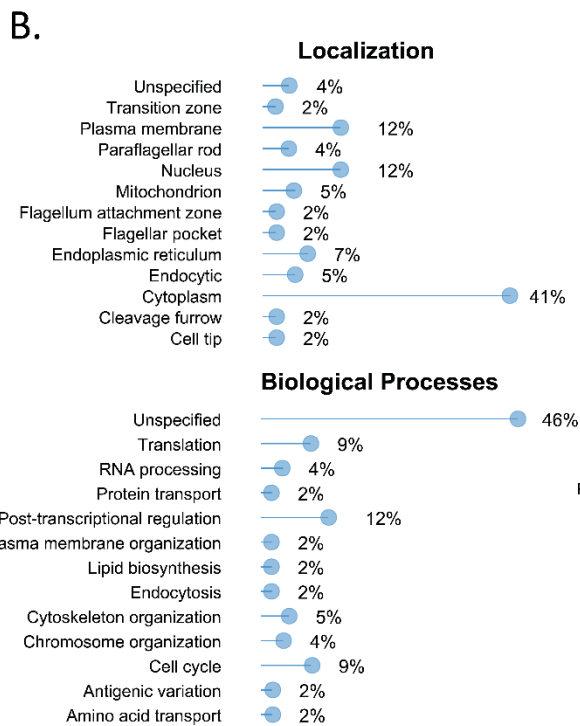
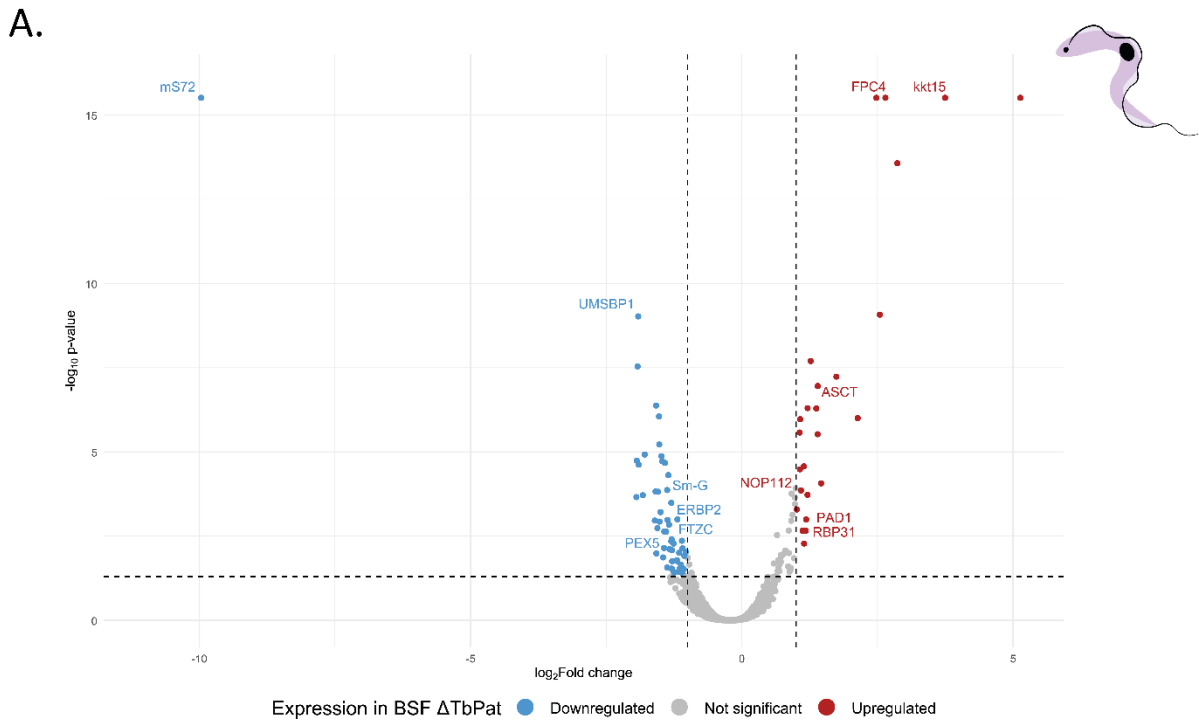


Figure 33: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme sanguine sauvage

A. Volcano plot des protéines retrouvées dans le protéome de *T. brucei* forme procyclique sauvage sans ou avec oléate selon les critères détaillés dans la section 2.2.6.2. **B.** et **C.** Lollipop plot des localisations et processus biologiques des protéines dont l'expression diminue (**B.**) ou augmente (**C.**) significativement.

De plus, des désaturases des acides gras et AceCS, une acétyl-CoA synthétase, voient aussi leur expression significativement diminuer 24 heures après l'ajout d'oléate. Tout comme la voie ELO, ces protéines pourraient ainsi être régulés selon la disponibilité en acide gras. La grande majorité (50 à 90%) des acides gras est incorporée dans les premières secondes par les parasites (Uttaro 2014); l'expression de ces protéines pourraient augmenter rapidement après l'ajout d'oléate, puis diminuer par l'intermédiaire de systèmes de régulation lorsque tout les acides gras métabolisés sont entrés dans les différentes voies. Le réticulum endoplasmique étant le lieu de synthèse des (phospho)lipides, c'est l'un des composants cellulaires les plus représentés, avec le cytoplasme (Figure 32B). En lien avec cette observation, les processus de la biosynthèse des lipides (dans le RE) et le métabolisme de l'acétyl-CoA (cytosolique) sont les processus biologiques les plus affectés (Figure 32B). Inversement, l'ajout d'oléate augmente significativement l'expression de la squalène synthase (SQS) après 24 heures. Cette protéine est impliquée dans la synthèse de stérols ; la surexpression de SQS pourrait être liée à un besoin de conserver les proportions entre les TAG et esters de stérols pour maintenir l'intégrité des gouttelettes lipidiques.

Chez les formes sanguines (Figure 33), on observe des diminutions significatives de l'expression de protéines cytosoliques et membranaires et protéines du noyau notamment, mais aucun processus biologique majeur n'apparaît, la majorité étant des protéines hypothétiques comme pour la forme procyclique (Figure 33B). On peut cependant voir que la traduction et régulation des gènes ainsi que le cycle cellulaire des parasites sont les processus biologiques les plus représentés (Figure 33B). Les protéines dont l'expression est augmentée sont principalement cytosoliques et mitochondriales, suivi de protéines retrouvés à proximité du kinétoplaste et la base du flagelle (kinétochore, complexe de Hook et poche flagellaire, voir Figure 9) (Figure 33C). Tout comme les protéines dont l'expression diminue, on retrouve chez les protéines surexprimées de nombreux processus biologiques : métabolisme, régulation de l'expression des gènes/protéines, transport, organisation cellulaire... Il est important de noter que la présence d'acides gras exogènes en forte concentration est létale pour les formes sauvages de *T. brucei* (Section 3.2.1.2, Figure 4), qui arrêtent leur croissance et finissent par mourir au bout de quelques jours ; ajouter de l'oléate une seule fois dans le milieu suffit pour observer ce phénotype.

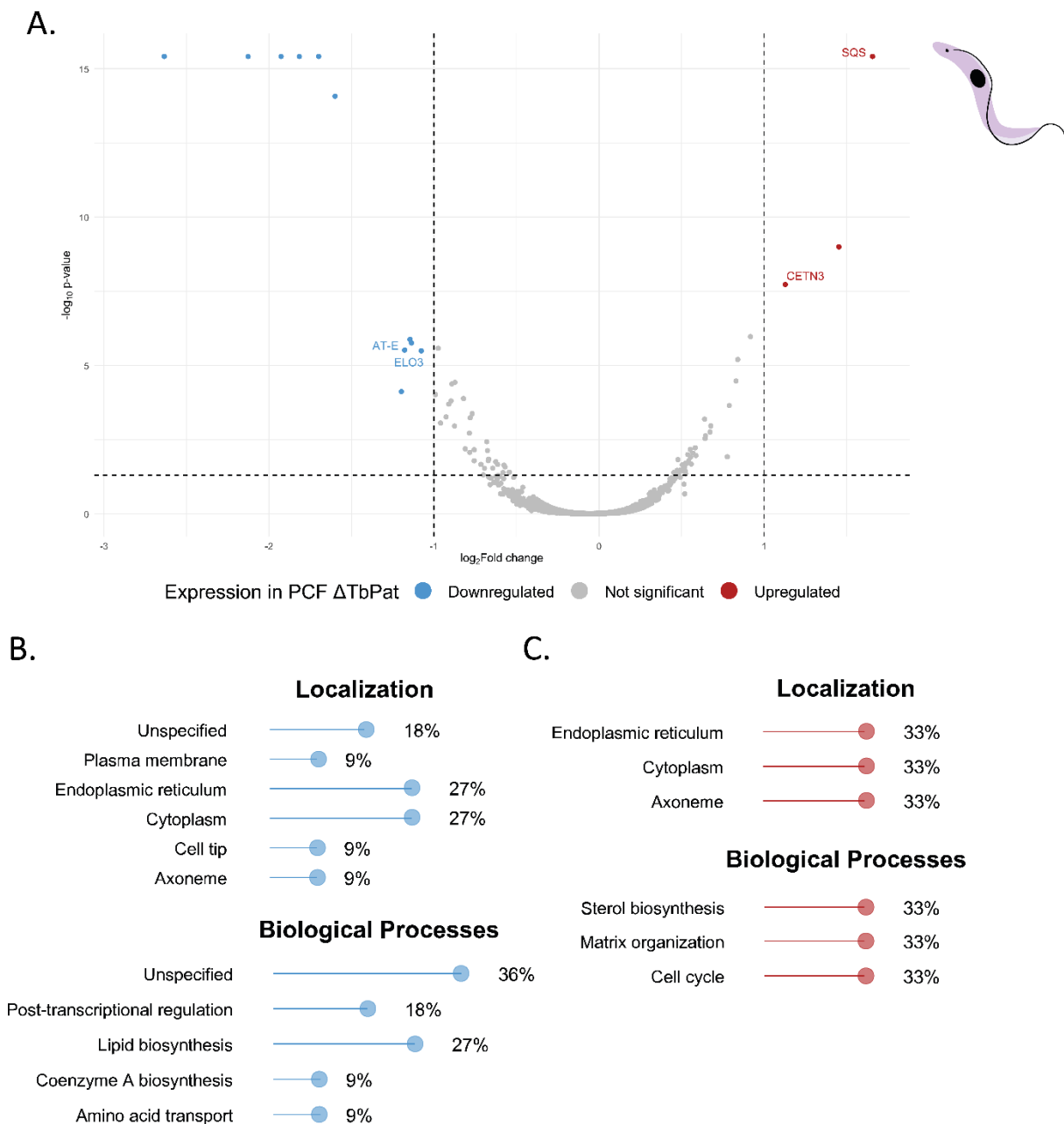


Figure 34: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme procyclique Δ TbPat

A. Volcano plot des protéines retrouvées dans le protéome de *T. brucei* forme procyclique sauvage sans ou avec oléate selon les critères détaillés dans la section 2.2.6.2. **B.** et **C.** Lollipop plot des localisations et processus biologiques des protéines dont l'expression diminue (**B.**) ou augmente (**C.**) significativement.

La modification de l'expression de certaines protéines pourrait donc être une conséquence de l'arrêt de croissance des parasites et une réponse au stress des cellules, sans lien avec la biologie des gouttelettes lipidiques et l'incorporation d'acides gras. De plus, la majorité des protéines impactées par l'ajout d'oléate chez les formes procycliques et sanguines sont hypothétiques et n'ont pas de processus biologique attribué (Figures 32 et 33); il est donc difficile d'apporter une conclusion sur les protéines et voies impactées par la présence d'oléate chez *T. brucei* au cours du cycle évolutif. On retrouve seulement quelques protéines communes chez ces deux formes, dont Tb927.2.3080, une oléate désaturase qui convertit l'oléate C18:1 en linéoléate C18:2 et dont l'expression diminue significativement chez les parasites procycliques et sanguins. Tout comme les autres désaturases, cette diminution pourrait être le résultat d'une régulation de l'expression de protéines métaboliques en fonction des besoins et quantités de substrats intracellulaires.

3.2.4.2. Chez les parasites Δ TbPat

La présence d'oléate chez les formes procycliques Δ TbPat montre des conséquences similaires sur le protéome que chez les parasites sauvages : on observe une diminution significative de protéines du RE comme ELO3 et de plusieurs acides gras désaturases, ainsi qu'une augmentation de SQS (Figure 34). Sur les 14 protéines retrouvées dans l'analyse de ces parasites, 8 sont également présentes dans le protéome des parasites sauvages nourris à l'oléate, avec un comportement identique pour chaque : si une protéine augmente chez les parasites sauvages, elle augmente également chez les parasites Δ TbPat. Les 6 autres protéines uniques au protéome de Δ TbPat en présence d'oléate incluent des protéines hypothétiques ainsi que CETN3, une centrine impliquée dans l'initiation de la cytokinèse et dont l'expression augmente. La délétion de TbPat n'a donc pas d'effet majeur sur le protéome de la forme procyclique de *T. brucei* après ajout d'acides gras exogènes par rapport aux parasites sauvages.

Chez les formes sanguines, l'ajout d'oléate a des répercussions importantes sur le protéome des parasites Δ TbPat (Figure 35). Tout comme les parasites sauvages, la présence d'oléate a pour conséquence l'arrêt de la croissance puis la mort des cellules ; on observe cependant, contrairement aux parasites sauvages, une diminution significative de protéines mitochondriales impliquées dans le métabolisme énergétique (cycle de Krebs, métabolisme de l'acétate, etc...) (Figure 35C et 35D).

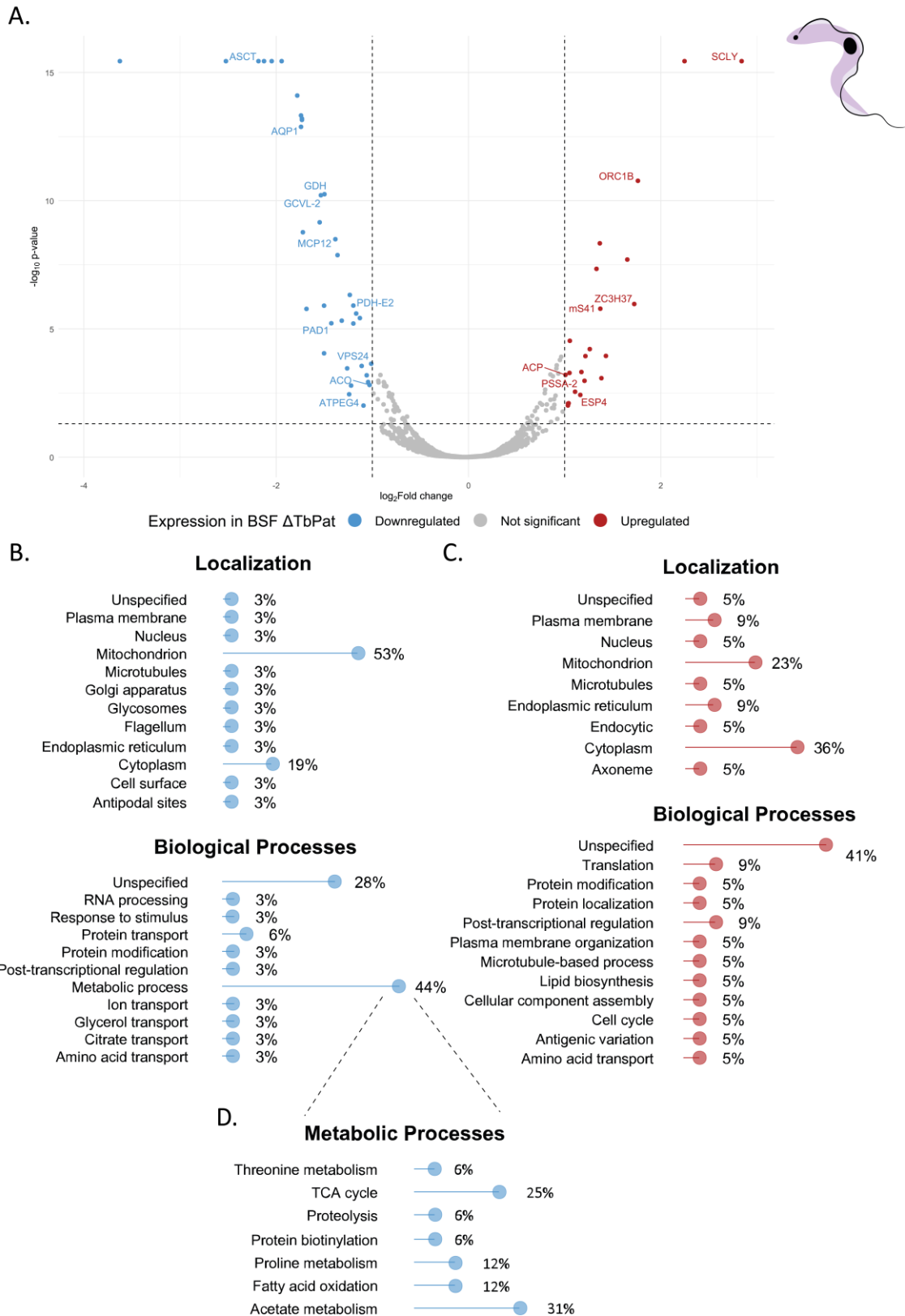


Figure 35: Effet de l'ajout d'oléate sur le protéome de la forme sanguine Δ TbPat

A. Volcano plot des protéines retrouvées dans le protéome de *T. brucei* forme procyclique sauvage sans ou avec oléate selon les critères détaillés dans la section 2.2.6.2. **B.** et **C.** Lollipop plot des localisations et processus biologiques des protéines dont l'expression diminue (**B.**) ou augmente (**C.**) significativement.

Ces protéines sont pourtant surexprimées chez les parasites Δ TbPat (Article, section 3.2.1.2, Figure 6). Ici, les niveaux d'expression de nombreuses protéines métaboliques reviennent même à un niveau similaire à celui observé chez les parasites sauvages sans oléate. L'ajout d'acides gras exogènes pourraient compenser le défaut de mobilisation des acides gras endogènes dus à la perte de TbPat ; les besoins de production de lipides à partir d'acétate diminuent, ayant pour conséquence une diminution de l'expression de protéines métaboliques mitochondriales. Les d'acides gras pourraient ainsi agir comme un signal permettant une régulation de l'expression des gènes codant pour les protéines impliquées dans le métabolisme de *T. brucei* : on retrouve notamment des modifications significatives de protéines régulant les processus de transcription et traduction, à la fois en diminution et augmentation d'expression (Figure 35B et 35C). TbPat, dont l'expression augmente significativement suite à la formation de nouvelles gouttelettes, pourrait également faire partie de cette voie de régulation. Presque la moitié des protéines sont cependant hypothétiques et n'ont donc pas de processus biologique attribué. Contrairement aux formes procycliques, la grande majorité des protéines retrouvées chez les parasites sauvages et Δ TbPat nourris en oléate sont différentes, et les quelques unes communes aux deux protéomes ont des comportements opposés. En effet, là où l'expression de plusieurs protéines diminue chez les parasites sauvages en présence d'oléate, ces mêmes protéines voient leur expression augmenter dans les mêmes conditions chez les parasites Δ TbPat.

Ces résultats indiquent que la modification des capacités de mobilisation et disponibilités en acides gras après délétion de TbPat ont des conséquences profondes sur le comportement des parasites, et témoigne de l'importance des gouttelettes lipidiques dans la régulation des besoins métaboliques des cellules. Le choix de réaliser cette expérience à 24 heures d'exposition à l'oléate s'est fait par rapport aux observations sur l'expression de TbPat, mais d'autres modifications du protéome pourraient être observées à différents temps d'exposition.

4. Discussion et perspectives

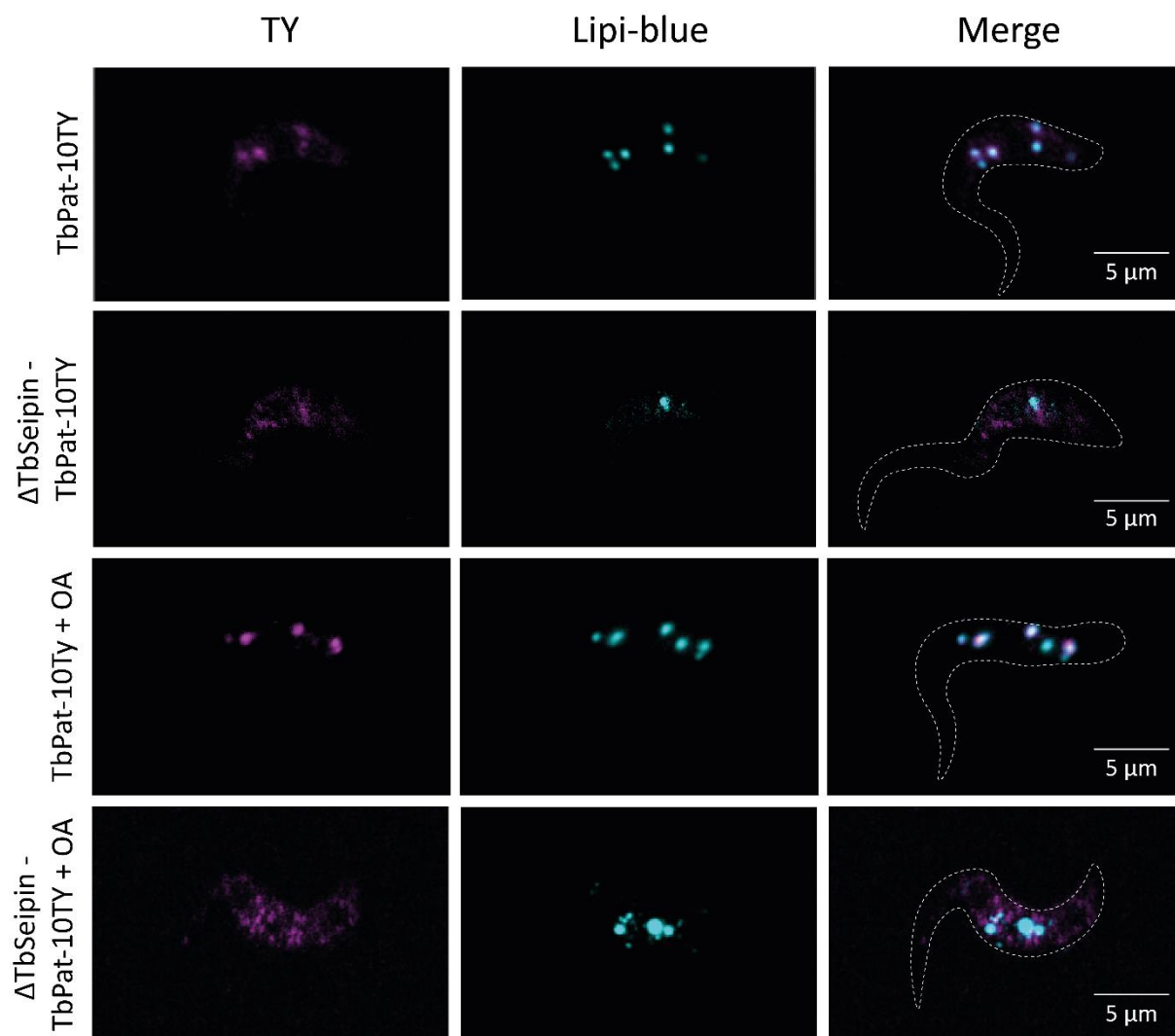


Figure 36 : Distribution de TbPat-10TY chez les parasites procycliques Δ TbSeipin avec ou sans oléate.

Analyse par immunofluorescence de la localisation de TbPat-10TY chez des parasites procycliques TbPat-10TY et ou Δ TbSeipin – TbPat-10TY. OA, oléate.

4.1. Le protéome des gouttelettes lipidiques de *Trypanosoma brucei*

La compréhension des mécanismes liés aux gouttelettes lipidiques nécessite de connaître les différents acteurs impliqués dans les voies de biogénèse, maintenance et dégradation de ce compartiment. Nous avons identifié, grâce à l'étude de TbPat, de nouvelles protéines potentiellement impliquées dans leur biologie.

4.1.1. Identification de nouvelles protéines associées aux gouttelettes lipidiques

4.1.1.1. TbSeipin

Comme expliqué en introduction, la protéine Seipin est une molécule clé de la biologie des LD, et critique dans leur formation. Le gène codant pour TbSeipin a été identifié au laboratoire et est en cours de caractérisation. L'insertion d'une étiquette 3Ty en C-terminal au locus de TbSeipin permettant sa localisation ainsi qu'une souche *knock-out* de la protéine dans les parasites procycliques (Δ TbSeipin) ont été réalisées par Kathyanna Arnould lors de son stage de master 2. La structure de la protéine, son expression et sa localisation constituent des données préliminaires qui ne font pas parti de mes travaux et ne sont ainsi pas présentés dans cette thèse. D'après la littérature, l'insertion des protéines dites ERTOLD de phase précoce à la surface des LD dépend notamment de la présence de Seipin. Pour vérifier si c'est le cas pour TbPat, protéine semblant utiliser cette voie ERTOLD, j'ai ajouté dans le mutant Δ TbSeipin de *T. brucei* forme procyclique une étiquette 10TY en 3' de la séquence codante de TbPat. J'ai ensuite réalisé une immunofluorescence des parasites Δ TbSeipin – TbPat10TY, avec et sans ajout d'oléate pendant 24 heures. La délétion de l'expression de TbSeipin amène à un phénotype de gouttelettes hétéromorphes en présence d'oléate, phénotype observé préalablement et caractéristique des mutants Δ TbSeipin chez différents organismes. Alors que chez les parasites TbPat-10TY, la protéine est clairement associée aux LD, on peut voir qu'en l'absence de la protéine TbSeipin, la localisation de TbPat apparait beaucoup plus diffuse et n'est plus seulement associée à la périphérie des LD (Figure 36). La présence de TbSeipin est ainsi nécessaire au déplacement de TbPat vers les gouttelettes lipidiques.

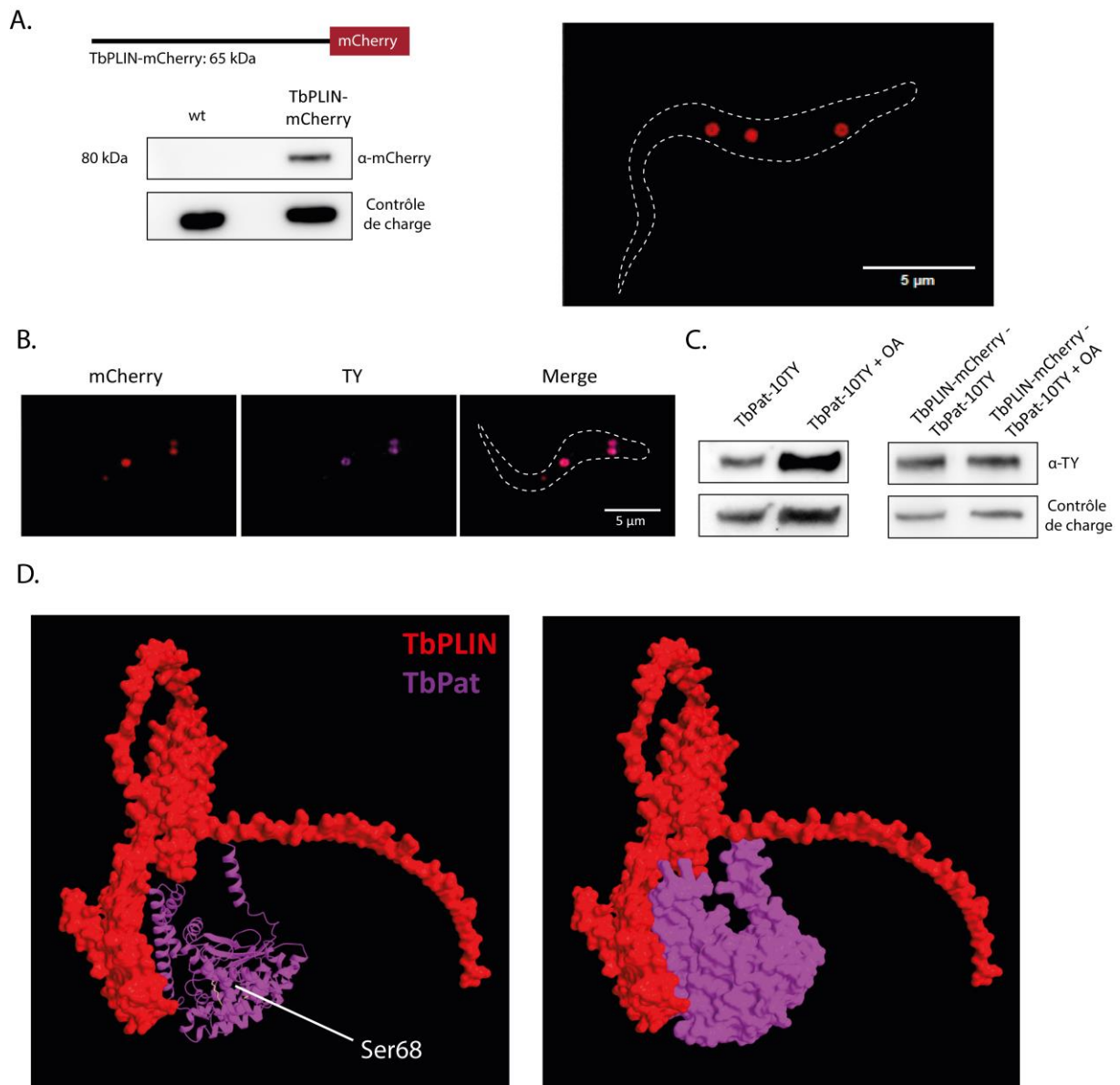


Figure 37 : Localisation de TbPLIN et interaction avec TbPat.

Une étiquette codant pour la protéine fluorescente mCherry a été ajoutée au 3' de la séquence codante de Tb927.7.2160 chez les parasites procycliques sauvages et TbPat-10TY. **A.** Western-blot et immunofluorescence de parasites procycliques sauvages (wt) ou TbPLIN-mCherry. **B.** Immunofluorescence de parasites procycliques TbPLIN-mCherry – TbPat-10TY. **C.** Western Blot des parasites procycliques TbPat-10TY ou TbPLIN-mCherry – TbPat-10TY avec ou sans oléate. **D.** Modèle AlphaFold3 des protéines TbPat (violet) et TbPLIN (rouge). OA, oléate.

4.1.1.2. TbPLIN

Les protéines perilipins humaines sont caractérisés par un « 11-mer », répétitions d'un nombre de 5 à 9 d'une séquence de 11 acides aminés. Nous avons recherché une protéine possédant ce type de répétitions chez *T. brucei*, mais nous n'avons pas pu en identifier. Cependant, nous avons trouvé chez le parasite *T. cruzi* une protéine annotée *perilipin-3-like*. Son orthologue chez *T. brucei*, Tb927.7.2160, est localisée à la surface des gouttelettes lipidiques d'après TrypTag. Tb927.7.2160 possède 44% de similarité de séquence avec la protéine humaine TIP47/PLIN3. Nous avons donc émis l'hypothèse que Tb927.7.2160 est une perilipin et l'avons nommé TbPLIN.

Pour vérifier la localisation de la protéine, j'ai inséré en 3' du gène codant pour TbPLIN une étiquette mCherry chez les parasites procycliques et sanguins (Figure 37A). La présence et l'expression de l'étiquette a été vérifiée par Western-Blot (Figure 37A). Il est intéressant de noter que TbPLIN possède un poids moléculaire attendu de 37 kDa et après ajout de l'étiquette mCherry, le poids théorique de la protéine de fusion est de 63 kDa. Cependant, les WB réalisés sur cette souche montrent un poids moléculaire de TbPLIN-mCherry d'environ 80 kDa. Cette augmentation du poids moléculaire pourrait être due à la présence d'une modification post-traductionnelle de la protéine, comme une phosphorylation, modification commune des perilipins humaines (Sztalryd et Brasaemle 2017). Il sera nécessaire de vérifier quel type de modification post-traductionnelle cette protéine possède et quels résidus sont concernés.

L'observation de cellules vivantes en épifluorescence montre une localisation de TbPLIN-mCherry au niveau de la surface des gouttelettes lipidiques (Figure 37A). Comme les perilipins couvrent la surface des LD, j'ai essayé d'utiliser cette protéine comme marqueur des LD chez *T. brucei* dans les formes procycliques et sanguines dans le but de l'utiliser pour i) l'observation des LD chez les cellules vivantes, ii) des expériences de colocalisations avec d'autres protéines, iii) s'affranchir de l'utilisation de colorants chez les formes sanguines, qui montrent une faible efficacité et reproductibilité. J'ai donc vérifié l'utilisation de TbPLIN-mCherry comme souche rapporteure des LD en réalisant un mutant double étiquette TbPLIN-mCherry – TbPat-10TY chez les formes procycliques.

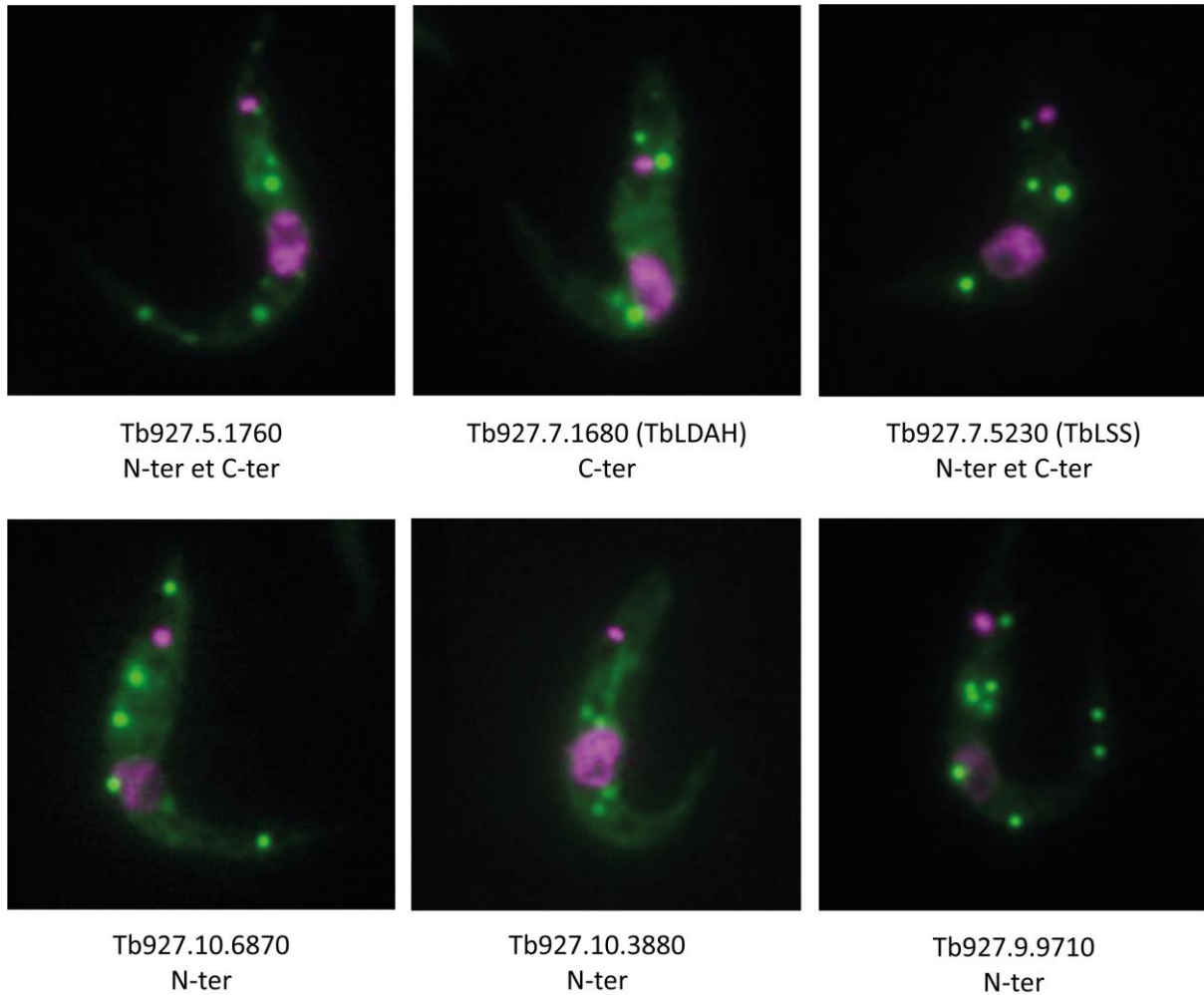


Figure 38 : Protéines ayant une localisation au niveau des gouttelettes lipidiques d'après la base de données TrypTag.

Les protéines ont été identifiées par la recherche textuelle « *lipid droplet* » sur TriTrypDB, sauf pour Tb927.10.3880, identifiée lors d'un BLAST sur GPAT3 de *H. sapiens* sur TriTrypDB. N-ter, N-terminal, C-ter, C-terminal : indique la position de la GFP par rapport à la protéine. TbPat, TbLDK et TbPLIN ne sont pas annotées ici car déjà caractérisées ou en cours de caractérisation.

Une analyse par immunofluorescence de ces souches montre que les deux protéines colocalisent au niveau des LD (Figure 37B), mais la présence de mCherry ou des deux étiquettes semble impacter l'expression de TbPat. En effet, alors que l'ajout d'oléate chez les parasites TbPat-10TY augmente fortement l'expression de la protéine en WB, la même expérience chez les doubles mutants montre qu'il n'y a pas d'augmentation de l'expression de TbPat (Figure 37C). Chez l'Homme, la protéine PLIN1 prévient l'activation de la PNPLA2 en se liant à son co-activateur CGI-58 (Sztalryd et Brasaemle 2017). TbPLIN et TbPat pourraient ainsi interagir pour contrôler l'activité de la phospholipase dans le but de réguler la balance production/mobilisation des gouttelettes ; si les protéines ne peuvent pas interagir à cause de la présence de l'étiquette, ou si TbPat ne peut pas se positionner correctement autour des gouttelettes, elle pourrait être dégradée plus rapidement. TbPLIN a notamment été identifiée comme une protéine impliquée dans la régulation des ARNm de *T. brucei* (Lueong et al. 2016) et un modèle AlphaFold des deux protéines montre de potentiels sites d'interaction ; on peut d'ailleurs observer que dans ce modèle, la sérine catalytique de TbPat (Ser68), est cachée par TbPLIN (Figure 37D). Il n'y a pas de différence apparente de la taille des gouttelettes lipidiques chez ce double mutant, donc cette augmentation de l'expression de TbPat ne semble pas être essentielle dans la dynamique de croissance ou dégradation des LD.

4.1.2. Caractériser le protéome des gouttelettes lipidiques

Des douzaines de protéines décorent la surface des LD des cellules humaines et levures, chacune jouant un rôle spécifique dans la biogénèse, le maintien ou la « mort » des LD. Elles interagissent et maintiennent ensemble une plateforme d'interaction et distribution des lipides dans la cellule. Chez *T. brucei*, seule une protéine localisée à la surface des LD a été caractérisée à ce jour : TbLDK, probablement impliquée dans la biogénèse des LD, bien que le rôle spécifique n'ait pas été déterminé (Flaspohler et al. 2010). TbPat est ainsi la seconde protéine du parasite à avoir une localisation confirmée sur les LD, et l'unique protéine à montrer un phénotype clair sur les LD. D'après le projet TrypTag, qui a pour but de localiser toutes les protéines de *T. brucei* par étiquetage avec une GFP (Billington et al. 2023), d'autres protéines ont une potentielle localisation au niveau des LD (Figure 38). Il sera nécessaire à l'avenir de confirmer cette localisation pour chacune des protéines.

Protéine	Origine de la séquence pour BLAST	Orthologue(s) chez <i>T. brucei</i>	e-value ¹	Localisation ²	Commentaire/Référence
ACSL	<i>H. sapiens</i>	TbACS4 (Tb927.9.4230)	2,00E-101	Cytoplasme	(Jiand et Englund. 2001), (Jiand et al. 2006)
		TbACS2 (Tb927.9.4200)	3,00E-101	Réticulum endoplasmique	
		TbACS3 (Tb927.9.4210)	1,00E-100	Cytoplasme	
		TbACS1 (Tb927.9.4190)	2,00E-98	Mitochondrie, cytoplasme	TrypTag : localisations N-ter/C-ter différentes
		TbLACS5 (Tb927.10.3260)	1,00E-94	Pas de données concluantes	
		Tb927.11.4490	7,00E-23	Mitochondrie, kinétoplaste	
	Tb927.11.7530	4,00E-12	Pas de données concluantes	TrypTag : localisations N-ter/C-ter différentes	
GPAT1	<i>H. sapiens</i>	TbDAT (Tb927.4.3160)	4,00E-38	Glycosomes	Caractérisée chez <i>L. major</i> (LmDAT) (Zefferey et Mamoun. 2006)
GPAT2	<i>H. sapiens</i>		4,00E-06		
GPAT3/AGPAT9/ AGPAT10	<i>H. sapiens</i>	Tb927.10.3880	2,00E-04	Gouttelettes lipidiques et réticulum endoplasmique	
		Tb927.3.3360	8,00E-09	Pas de données	
GPAT4/AGPAT6	<i>H. sapiens</i>		7,00E-10		
AGPAT1	<i>H. sapiens</i>	Tb927.11.15150	1,00E-06	Pas de données	
AGPAT2	<i>H. sapiens</i>		6,00E-05		
AGPAT3	<i>H. sapiens</i>	Tb927.5.2280	3,00E-12	Réticulum endoplasmique	
AGPAT4	<i>H. sapiens</i>		3,00E-14		
AGPAT5	<i>H. sapiens</i>		2,00E-12		
AGPAT7	<i>H. sapiens</i>	Tb927.3.3360	3,00E-29	Pas de données	
		Tb927.10.3880	3,00E-25	Gouttelettes lipidiques et réticulum endoplasmique	
AGPAT8	<i>H. sapiens</i>	Tb927.5.2280	5,00E-36	Réticulum endoplasmique	
AGPAT11	<i>H. sapiens</i>	Tb927.3.3360	3,00E-28	Pas de données	
		Tb927.10.3880	6,00E-29	Gouttelettes lipidiques et réticulum endoplasmique	

Tableau 7 (Partie 1) : Orthologues chez *T. brucei* des protéines associées aux gouttelettes lipidiques mentionnées dans la section 1.3.

Les orthologues sont déterminés selon différents critères : i) BLAST donnant une e-value inférieure à e^{-4} chez la souche Tb927, ii) protéine déjà caractérisée, iii) protéine annotée dans TriTrypDB chez Tb927 ou un organisme dont une protéine orthologue existe chez Tb927. ¹La e-value est annotée uniquement si la protéine a été identifiée suite à un BLAST. ²La localisation provient soit de TrypTag, soit d'un article référencé.

Il est aussi important de noter que l'annotation de localisation de TrypTag n'est pas basée sur des colocalisations mais est uniquement visuelle, et la fusion de chaque protéine avec une GFP, d'un poids moléculaire de 27 kDa, peut interférer avec la localisation de certaines protéines en modifiant la conformation, l'accès aux séquences d'adressage/domaines transmembranaires, etc... Ainsi, d'autres protéines de *T. brucei* pourraient être localisées sur les gouttelettes lipidiques mais ne sont pas annotées comme tel par l'équipe TrypTag, ou la localisation a été modifiée par la présence de l'étiquette. On retrouve dans le Tableau 7 de potentielles nouvelles protéines associées à la biologie des gouttelettes lipidiques, basé sur l'orthologie avec des protéines humaines ou levures mentionnées dans l'introduction (Section 1.3), sur les annotations disponibles sur TriTrypDB ou la littérature.

Pour déterminer plus précisément le protéome entier des LD du parasite, plusieurs options sont envisageables :

- **Immunoprécipitation.** Cette option permettrait d'identifier des partenaires d'une protéine d'intérêt, mais omet les interactions transitoires, de faible affinité et ne convient pas à l'étude des protéines faiblement solubles comme les protéines membranaires, hors les protéines des LD sont souvent fortement associées à la monocouche des LD par l'intermédiaire de domaines hydrophobes.
- **Purification des gouttelettes lipidiques.** Cette méthode permet également de tester le contenu lipidique des gouttelettes et les possibles modifications chez des souches *knock-out/knock-down*. Des protocoles de purification des LD sont disponibles et devront être adaptés pour l'application chez *T. brucei*. Cependant, nous ne savons pas encore si les LD de *T. brucei* sont libérées dans le cytosol comme chez l'Homme ou si elles restent attachées au réticulum endoplasmique après biogénèse, comme c'est le cas chez les levures. L'attachement des LD au RE pourrait représenter une difficulté pour la purification des gouttelettes et l'identification de protéines spécifiques à ce compartiment.
- **Marquage de proximité par des systèmes enzymatiques.** On retrouve notamment la technique du BioID (*proximity-dependent biotinylation identification*) qui dépend de la protéine BirA d'*Escherichia coli* ainsi que le système APEX2, basé sur une peroxydase de soja génétiquement modifiée. Ces protéines possèdent une capacité naturelle de biotinylation des protéines et peuvent être ainsi couplées à de l'analyse protéomique pour l'identification de complexes

Protéine	Origine de la séquence pour BLAST	Orthologue(s) chez <i>T. brucei</i>	e-value ¹	Localisation ²	Commentaire/Référence
PAP/Lipin	<i>H. sapiens</i>	TbLpn (Tb927.7.5450)		Cytoplasme	Caractérisée. Gène essentiel (Dawoody Nejad et al. 2018)
DGAT2	<i>H. sapiens</i>	Tb927.11.2210	8,00E-19	Mitochondrie	
		Tb927.3.1700	1,00E-60	Réticulum endoplasmique	
Lro1	<i>S. cerevisiae</i>	Tb927.11.13220	1,00E-76	Réticulum endoplasmique	
Dga1	<i>S. cerevisiae</i>	Tb927.3.1700	2,00E-51	Réticulum endoplasmique	
		Tb927.11.2210	3,00E-20	Mitochondrie	
Seipin	<i>H. sapiens</i> , <i>S. cerevisiae</i>	TbSeipin identifiée - en cours de caractérisation			Basé sur l'annotation chez <i>Bodo saltans</i> ; structure AlphaFold similaire aux autres Seipin
ATGL/PNPLA2	<i>H. sapiens</i>	Tb927.11.3940	4,00E-06	Mitochondrie	
		TbPat (Tb927.4.1780)	3,00E-04	Gouttelettes lipidiques	
CGI-58	<i>H. sapiens</i>	Tb927.8.2110	2,00E-46	Cytoplasme	
MGL	<i>H. sapiens</i>	TbMGL1 (Tb927.4.4360)	1,00E-41	Pas de données	Protéines taguées en C-terminal avec un 3HA ou 3TY au laboratoire; signal non concluant
		TbMGL2 (Tb927.8.8020)	4,00E-38	Pas de données	
Rab7		TbRAB7 (Tb927.9.11000)	8,00E-68	Cytoplasme	
PLIN3/TIP47		TbPLIN (Tb927.7.2160)		Gouttelettes lipidiques	Basé sur l'annotation chez <i>T. cruzi</i>
MFN2		TbMfn (Tb927.7.2410)		Mitochondrie	Caractérisée au laboratoire (Morel et al. 2023)
Opa1	<i>H. sapiens</i>	TbDLP1 (Tb927.3.4720)	2,00E-26	Mitochondrie et poche flagellaire	(Benz et al. 2017)
		TbDLP2 (Tb927.3.4760)	4,00E-27	Poche flagellaire	(Chanez et al. 2006), (Benz et al. 2017)
PEX2	<i>H. sapiens</i>	TbPEX2 (Tb927.3.2340)	3,00E-15	Glycosomes	
PGFS	<i>L. major</i>	TbPGFS (Tb927.11.4700)		Cytoplasme	(Kubata et al. 2000)
ATG8	<i>S. cerevisiae</i>	TbATG8.1 (Tb927.7.5900)	2,00E-41	Cytoplasme	(Williams et al. 2009), (Li et al. 2012)
		TbATG8.2 (Tb927.7.5910)	2,00E-43	Cytoplasme	
		TbATG12 (Tb927.7.3320)	2,00E-25	Pas de données concluantes	(Williams et al. 2009)

Tableau 7 (Partie 2) : Orthologues chez *T. brucei* des protéines associées aux gouttelettes lipidiques mentionnées dans la section 1.3.

Les orthologues sont déterminés selon différents critères : i) BLAST donnant une e-value inférieure à e^{-4} chez la souche Tb927, ii) protéine déjà caractérisée, iii) protéine annotée dans TriTrypDB chez Tb927 ou un organisme dont une protéine orthologue existe chez Tb927. ¹ La e-value est annotée uniquement si la protéine a été identifiée suite à un BLAST. ²La localisation provient soit de TrypTag, soit d'un article référencé.

Ces techniques ont l'avantage d'être adaptées aux protéines membranaires et interagissant avec d'autres protéines de façon transitoire. Nous avons produit pendant la thèse un plasmide Ty-BirA-TbPat que nous avons transfecté dans les parasites procycliques sauvages. Cependant, la protéine de fusion Ty-BirA-TbPat est localisée dans le réticulum endoplasmique des parasites et n'atteint pas les gouttelettes lipidiques. Le système APEX2 a déjà été utilisé pour purifier des gouttelettes lipidiques humaines et isoler leur protéome (Peterson et al. 2021); c'est une technique envisagée pour la suite du projet. Une possible protéine appât pour l'identification du protéome des LD est TbPLIN ; en effet, les perilipins sont souvent localisées tout autour de la membrane des LD et sont par ailleurs associées à des protéines d'autres compartiments *via* des sites de contact membranaires. Cela permettrait ainsi l'identification de protéines associées aux LD, mais également des protéines d'autres compartiments interagissant avec les LD.

L'identification des interactions protéine – protéine et de potentiels complexes est nécessaire à l'étude globale des LD. En effet, les protéines présentes à leur surface ne sont pas les seules impliquées dans leur biologie ; on retrouve notamment des protéines résidentes du RE qui possèdent des rôles dans la biogénèse des LD, mais également en amont dans la production des TAG qui formeront plus tard le cœur de ces organites.

4.1.3. Le lipidome des gouttelettes lipidiques

En plus du protéome, le contenu lipidique des gouttelettes reste également à définir chez les parasites protozoaires. En tant que plateforme cellulaire des lipides, les LD doivent être capables de répondre aux besoins des parasites, et ce tout au long du cycle évolutif et des différents environnements auxquels sont confrontés ces organismes. Il a notamment été montré chez *P. falciparum* que dans les globules rouges, la composition en TAG dans les LD change constamment pendant la maturation des parasites et la différenciation (Lee et al. 2024). La dynamique des LD et de la cellule entière est donc également dépendante, en plus de son protéome, des lipides retrouvés à l'intérieur. Les différentes étapes de différenciation chez *T. brucei* pourraient être couplées à un remodelage du contenu lipidique des gouttelettes du parasite, pour permettre la modification de la morphologie du parasite et de ses organites au cours du cycle. La caractérisation du lipidome des LD nécessite d'être capable de purifier les gouttelettes lipidiques, ce que nous n'avons pas fait chez *T. brucei* mais qui devra être réalisé, si possible dans toutes les étapes du cycle du parasite.

4.2. Quels sont les rôles des gouttelettes lipidiques chez les protozoaires ?

4.2.1. Interactions hôtes - parasites

Les gouttelettes lipidiques participent activement aux infections parasitaires, du côté des pathogènes mais également de l'hôte. Comme expliqué dans l'introduction, les LD sont le site de production d'éicosanoïdes chez *Leishmania* et *T. cruzi*, mais également chez les leucocytes (macrophages, neutrophiles...). Chez les cellules mammifères, la production de nouvelles LD lors de l'infection est directement liée à l'activation du système immunitaire et de la production de molécules ou facteurs de transcription liés à l'inflammation (Melo et al. 2011). Comme vu précédemment, les parasites protozoaires utilisent à la fois leurs gouttelettes mais aussi celles de l'hôte pour survivre. Chez *P. falciparum*, les LD participent à la détoxification de l'hème, un processus essentiel à la survie des parasites dans les globules rouges de l'hôte (Jackson et al. 2004) tandis que *Toxoplasma* est capable d'exploiter le contenu des LD des cellules hôtes pour sa propre croissance (Nolan et al. 2017). Chez les Kinétoplastidés *Leishmania* et *T. cruzi*, la production de prostaglandine à partir d'acide arachidonique présent dans les LD des parasites pourraient participer la réponse immunitaire (Araújo-Santos et al. 2014; Toledo et al. 2016).

Chez *T. brucei*, aucun lien direct entre les LD du parasite et l'infection n'a été démontré. Comme mentionné dans l'introduction, *T. brucei* est un parasite extracellulaire, différence majeure avec les autres Kinétoplastidés. Alors que *Leishmania* ou *T. cruzi* sont en interaction constante avec les cellules hôtes et peuvent détourner la machinerie interne de production de lipides ou autres métabolites de l'hôte pour répondre à leurs besoins, *T. brucei* dépend plus ou moins des molécules présentes dans le milieu extracellulaire et de ses propres voies métaboliques. *T. brucei* produit de l'acide arachidonique par l'intermédiaire lipases non-identifiées (Eintracht et al. 1998; Ridgley et Ruben 2001), mais le site de stockage de la molécule n'est pas connu. Le parasite possède également une prostaglandine F synthase active mais sa localisation intracellulaire et l'influence de la production de ce métabolite dans la pathogénicité des trypanosomes africains n'ont pas été déterminés (Kubata et al. 2000). Si le rôle des LD de *T. brucei* dans l'infection de l'hôte mammifère n'a pas été étudié, on sait que la dégradation des LD des adipocytes de l'hôte ont potentiellement un rôle protecteur lors de l'infection par le trypanosome.

En effet, la lipolyse chez les adipocytes de souris infectées par le parasite augmente significativement au début de l'infection, en réponse à l'activation du système immunitaire de l'animal. Des souris n'exprimant pas PNPLA2/ATGL, qui catalyse la première étape de la lipolyse, meurent plus vite et ont une charge parasitaire 10 fois plus élevée dans le tissu adipeux 10 jours post-infection (Machado et al. 2023). La présence d'acides gras résultant de la lipolyse serait ainsi toxique pour la forme sanguine de *T. brucei* ; *in vitro*, la co-culture d'adipocytes traités avec de la forskoline, un activateur de la lipolyse, et de parasites empêche la croissance de *T. brucei* (Machado et al. 2023). Cette observation est consistante avec l'expérience d'ajout d'oléate que j'ai réalisée chez la forme sanguine de *T. brucei* : les parasites ne poussent plus et meurent au bout de quelques jours.

Pendant le développement dans l'insecte vecteur, les parasites nécessitent de grandes quantités d'énergie pour leur migration dans différents organes ; les réservoirs lipidiques pourraient ainsi être formés dans les premiers stades de développement dans l'insecte, pour être utilisés lors de la migration des parasites jusqu'aux glandes salivaires. Pour vérifier cela, il sera nécessaire d'infecter des mouches et d'isoler des parasites dans les différents organes du parasite pour regarder la taille et le contenu des gouttelettes.

4.2.2. Communications inter-organites

L'un des rôles majeurs attribuables aux gouttelettes lipidiques, qui est la distribution de lipides à d'autres organites de la cellule, implique des zones d'interactions et d'échanges entre les compartiments intracellulaires. Les LD sont connues pour interagir avec de nombreux organites : réticulum endoplasmique, mitochondrie, péroxysomes, lysosomes/vacuoles... par l'intermédiaire des sites de contact membranaires (SCM). Ces échanges dynamiques impliquent également des mouvements et repositionnements des compartiments par le cytosquelette (Liao et al. 2022). L'étude des SCM chez les parasites protozoaires reste limitée et n'implique jusqu'à présent pas les gouttelettes lipidiques (Santos et Nozaki 2021), bien que des contacts entre les LD et le RE dans les stades érythrocytaires, ainsi que des contacts avec la vacuole alimentaire, la mitochondrie, la membrane plasmique ou le noyau à différents stades de développement de *P. falciparum* ont été récemment observés (J. Lee et al. 2024). Les parasites protozoaires possèdent des organites qui leur sont propres, avec l'apicoplaste chez les Apicomplexes, et le kinétoplaste, les glycosomes et une mitochondrie unique chez les Kinétoplastidés.

L'étude des SCM devra ainsi inclure ces compartiments pour comprendre le rôle global des LD chez les protozoaires. Les glycosomes, compartiments apparentés aux péroxyosomes, représentent notamment un site de distribution du glycérol par les gouttelettes lipidiques. En effet, *in vitro* chez la forme procyclique de *T. brucei*, en absence de glucose dans le milieu de culture, les parasites sont capables de lier le métabolisme de la proline à celui du glucose par deux enzymes, PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) et PPDK (pyruvate phosphate dikinase), qui permettent la production d'un précurseur essentiel à plusieurs voies métaboliques, le G-6-P (glucose-6-phosphate) par une voie inverse à la glycolyse, la néoglucogenèse (Wagnies et al. 2018). Or, il a été démontré par l'équipe qu'en absence de glucose et des protéines PEPCCK et PPDK, les parasites survivent et leur croissance est peu affectée grâce à l'utilisation du glycérol pour alimenter la voie de la néoglucogenèse. La source de glycérol pour ces parasites n'a pas encore été identifiée mais ne provient pas du milieu de culture, trop peu concentré en glycérol (Wagnies et al. 2018). Une source potentielle est la lipolyse des lipides contenus dans les LD, qui permet la production d'acides gras et de glycérol. Des SCM entre les glycosomes et les LD pourraient permettre le passage de lipides vers les glycosomes, à condition que des lipases soient capables de produire du glycérol dans ou à proximité des glycosomes. Les trypanosomes africains possèdent de nombreuses lipases putatives dans leur génome (www.tritrypdb.org), dont des monoglycéride lipases dont le rôle est la production de glycérol (Tableau 7). La fonction et la localisation de la majorité de ces lipases restent à déterminer.

Les SCM entre les mitochondries et les LD sont également essentiels pour maintenir la structure et viabilité des cellules. Les contacts entre ces deux organites permettent la distribution d'acides gras des LD vers les mitochondries pour la production d'énergie par la β -oxydation. Dans le sens inverse, les mitochondries pourraient participer à la croissance des LD à partir du RE ou dans le cytosol par le transfert d'énergie ou de métabolites vers les gouttelettes (Monteiro-Cardoso et Giordano 2024). Plusieurs protéines, dont les perilipins, ont été identifiées dans le contexte des SCM chez l'Homme (Schuldiner et Bohnert 2017), mais l'existence de ces contacts reste à être démontrée chez les parasites protozoaires. Dans la forme procyclique de *T. brucei*, la mitochondrie, fortement active, est réticulée et s'étend le long du parasite, tout comme le réticulum endoplasmique (Figure 9).

Ces structures permettent de nombreuses zones d'interactions entre les deux compartiments pour l'échange de lipides, le réticulum endoplasmique étant le compartiment de production des phospholipides (Monteiro-Cardoso et Giordano 2024). D'après les images obtenues en épifluorescence, les gouttelettes lipidiques, provenant du RE, semblent pouvoir apparaître sur toute la longueur de *T. brucei*, offrant une grande région d'interactions entre les LD, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique.

La cartographie des SCM de *Trypanosoma* peut être résolue de plusieurs manières, notamment par des techniques de microscopie. Chez *T. brucei*, organisme de quelques μm , la résolution en microscopie plein champ n'est pas assez puissante pour permettre l'observation des sites de contact entre différents organites. D'autres techniques plus résolutive sont disponibles pour l'étude des compartiments des trypanosomes, comme la microscopie d'expansion sur l'ultrastructure (U-ExM, *ultrastructure expansion microscopy*) (Gambarotto et al. 2019). Cette méthode permet d'obtenir une forte résolution en conservant l'ultrastructure des cellules, qui sont ensuite observables en microscopie optique. J'ai essayé d'appliquer l'U-ExM chez les parasites TbPat-10TY et TbPLIN-mCherry dans le but d'observer les LD du parasite et leur potentielle association avec le réticulum endoplasmique à l'aide un anticorps dirigé contre une protéine du RE. Je n'ai cependant pas pu observer les protéines après expansion, probablement à cause de la perte des LD pendant la préparation des cellules (Laporte et al. 2023). Il n'existe à ce jour pas de protocole permettant la conservation des LD lors de l'expansion ; le gain de résolution apporté par cette technique pour l'observation de l'organisation cellulaire des parasites étant important, il sera nécessaire d'adapter le protocole pour résoudre ce problème. Une possible alternative est la cryo-microscopie à expansion. Cette technique inclut une cryo-fixation des cellules avant expansion, permettant de préserver les lipides membranaires et d'observer les cellules dans un état presque natif (Laporte et al. 2022). La microscopie électronique est également un outil puissant pour observer l'ultrastructure cellulaire et l'une des techniques les plus utilisées pour l'étude des SCM.

Outre les techniques visuelles, l'interaction spécifique d'une protéine avec un autre compartiment peut être déterminée par l'utilisation de techniques comme l'immunoprécipitation ou le marquage de proximité, mentionnées précédemment.

5. Conclusion

L'intérêt exponentiel qu'ont gagné les gouttelettes lipidiques ces dernières décennies a permis de montrer les rôles critiques de ce compartiment atypique, dont l'importance a longtemps été sous-estimée. La compréhension des fonctions des gouttelettes lipidiques nécessite cependant de s'intéresser à tous les types d'organismes capables d'en produire. Chez les parasites protozoaires, l'attention portée aux gouttelettes est très récente et montre déjà des fonctions diverses dans la vie et survie de ces organismes : métabolisme, réponse immunitaire, résistance aux médicaments, différenciation... Il reste encore tout à découvrir sur cet organite et son importance chez les pathogènes unicellulaires eucaryotes. Cette étude a permis de s'intéresser et caractériser de nouvelles protéines impliquées dans la régulation de la biologie des gouttelettes chez les trypanosomes, et constitue une première étape vers la compréhension globale de leur rôle chez les parasites protozoaires. Il reste en effet de nombreuses zones d'ombre : le système de régulation de l'expression de TbPat, les liens entre les gouttelettes et les autres compartiments, la distribution des acides gras des gouttelettes dans les différentes voies métaboliques, les rôles de l'organite lors de l'infection, etc... De par ses nombreux avantages, *Trypanosoma brucei* représente un excellent modèle de l'étude des compartiments cellulaires, et nous permettra d'en apprendre plus sur l'importance des gouttelettes chez tous les organismes eucaryotes.

« *Le gras, c'est la vie.* » Karadoc, Kaamelott, Livre II.

6. Bibliographie

- Acosta-Serrano, A., R. N. Cole, A. Mehlert, M. G. Lee, M. A. Ferguson, et P. T. Englund. 1999. « The Procyclin Repertoire of *Trypanosoma Brucei*. Identification and Structural Characterization of the Glu-Pro-Rich Polypeptides ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 29763-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29763>.
- Adeyo, Oludotun, Patrick J. Horn, SungKyung Lee, Derk D. Binns, Anita Chandrahas, Kent D. Chapman, et Joel M. Goodman. 2011. « The yeast lipin orthologue Pah1p is important for biogenesis of lipid droplets ». *The Journal of Cell Biology* 192 (6): 1043-55. <https://doi.org/10.1083/jcb.201010111>.
- Aitcheson, Niall, Suzanne Talbot, Jesse Shapiro, Katie Hughes, Carl Adkin, Thomas Butt, Karen Sheader, et Gloria Rudenko. 2005. « VSG switching in *Trypanosoma brucei*: antigenic variation analysed using RNAi in the absence of immune selection ». *Molecular microbiology* 57 (6): 1608-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04795.x>.
- Aksoy, Serap. 2003. « Control of tsetse flies and trypanosomes using molecular genetics ». *Veterinary Parasitology*, Old Dreams-New Visions: Veterinary Parasitology in the 21st Century., 115 (2): 125-45. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00203-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00203-6).
- Aksoy, Serap, Wendy C. Gibson, et Michael J. Lehane. 2003. « Interactions between Tsetse and Trypanosomes with Implications for the Control of Trypanosomiasis ». *Advances in Parasitology* 53:1-83. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(03\)53002-0](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(03)53002-0).
- Allmann, Stefan, Muriel Mazet, Nicole Ziebart, Guillaume Bouyssou, Laetitia Fouillen, Jean-William Dupuy, Marc Bonneau, Patrick Moreau, Frédéric Bringaud, et Michael Boshart. 2014. « Triacylglycerol Storage in Lipid Droplets in Procyclic *Trypanosoma Brucei* ». *PLoS One* 9 (12): e114628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114628>.
- Almeida, Patrícia E. de, Daniel A. M. Toledo, Gabriel S. C. Rodrigues, et Heloisa D'Avila. 2018. « Lipid Bodies as Sites of Prostaglandin E2 Synthesis During Chagas Disease: Impact in the Parasite Escape Mechanism ». *Frontiers in Microbiology* 9 (mars):499. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00499>.
- Aloulou, Ahmed, Renaud Rahier, Yani Arhab, Alexandre Noiriél, et Abdelkarim Abousalham. 2018. « Phospholipases: An Overview ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1835:69-105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3.
- Ambele, Melvin A., B. Trevor Sewell, Franscious R. Cummings, Peter J. Smith, et Timothy J. Egan. 2013. « Synthetic Hemozoin (β -Hematin) Crystals Nucleate at the Surface of Neutral Lipid Droplets that Control Their Sizes ». *Crystal growth & design* 13 (10): 10.1021/cg4009416. <https://doi.org/10.1021/cg4009416>.
- Ammar, Zeinab, Nicolas Plazolles, Théo Baltz, et Virginie Coustou. 2013. « Identification of Trans-Sialidases as a Common Mediator of Endothelial Cell Activation by African Trypanosomes ». *PLoS Pathogens* 9 (10): e1003710. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003710>.

- Andrade, Yasmin Monara Ferreira de Sousa, Monara Viera de Castro, Victor de Souza Tavares, Rayane da Silva Oliveira Souza, Lúcia Helena Faccioli, Jonilson Berlink Lima, Carlos Arterio Sorgi, Valéria M. Borges, et Théo Araújo-Santos. 2023. « Polyunsaturated Fatty Acids Alter the Formation of Lipid Droplets and Eicosanoid Production in Leishmania Promastigotes ». *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 118:e220160. <https://doi.org/10.1590/0074-02760220160>.
- Aoki, Junken, Asuka Inoue, Kumiko Makide, Naoya Saiki, et Hiroyuki Arai. 2007. « Structure and Function of Extracellular Phospholipase A1 Belonging to the Pancreatic Lipase Gene Family ». *Biochimie*, Recent developments in biosynthesis, storage and transport of lipids, 89 (2): 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.021>.
- Araújo-Santos, Théo, Nilda E. Rodríguez, Sara Moura-Pontes, Upasna Gaur Dixt, Daniel R. Abánades, Patrícia T. Bozza, Mary E. Wilson, et Valéria Matos Borges. 2014. « Role of Prostaglandin F2 α Production in Lipid Bodies From Leishmania infantum chagasi: Insights on Virulence ». *The Journal of Infectious Diseases* 210 (12): 1951-61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu299>.
- Arlt, Henning, Xuewu Sui, Brayden Folger, Carson Adams, Xiao Chen, Roman Remme, Fred A. Hamprecht, et al. 2022. « Seipin Forms a Flexible Cage at Lipid Droplet Formation Sites ». *Nature Structural & Molecular Biology* 29 (3): 194-202. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00718-y>.
- Asad, Mohd, Yoshiki Yamaryo-Botté, Mohammad E. Hossain, Vandana Thakur, Shaifali Jain, Gaurav Datta, Cyrille Y. Botté, et Asif Mohammed. 2021. « An essential vesicular-trafficking phospholipase mediates neutral lipid synthesis and contributes to hemozoin formation in Plasmodium falciparum ». *BMC Biology* 19 (août):159. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01042-z>.
- Asencio, Corinne, Perrine Hervé, Pauline Morand, Quentin Oliveres, Chloé Alexandra Morel, Valérie Prouzet-Mauleon, Marc Biran, et al. 2024. « Streptococcus Pyogenes Cas9 Ribonucleoprotein Delivery for Efficient, Rapid and Marker-Free Gene Editing in Trypanosoma and Leishmania ». *Molecular Microbiology* 121 (6): 1079-94. <https://doi.org/10.1111/mmi.15256>.
- Autheman, Delphine, Cécile Crosnier, Simon Clare, David A. Goulding, Cordelia Brandt, Katherine Harcourt, Charlotte Tolley, et al. 2021. « An Invariant Trypanosoma Vivax Vaccine Antigen Induces Protective Immunity ». *Nature* 595 (7865): 96-100. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03597-x>.
- Balogun, R. A. 1974. « Studies on the amino acids of the tsetse fly, Glossina morsitans, maintained on in vitro and in vivo feeding systems ». *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 49 (2): 215-22. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(74\)90110-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(74)90110-8).
- Banks, K. L. 1980. « Injury Induced by Trypanosoma Congolense Adhesion to Cell Membranes ». *The Journal of Parasitology* 66 (1): 34-37.
- Bannykh, S I, T Rowe, et W E Balch. 1996. « The organization of endoplasmic reticulum export complexes. » *Journal of Cell Biology* 135 (1): 19-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.1.19>.

- Baral, Toya Nath. 2010. « Immunobiology of African Trypanosomes: Need of Alternative Interventions ». *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2010:389153. <https://doi.org/10.1155/2010/389153>.
- Benne, Rob, Janny Van Den Burg, Just P. J. Brakenhoff, Paul Sloof, Jacques H. Van Boom, et Marijke C. Tromp. 1986. « Major Transcript of the Frameshifted CoxII Gene from Trypanosome Mitochondria Contains Four Nucleotides That Are Not Encoded in the DNA ». *Cell* 46 (6): 819-26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90063-2).
- Berberof, M., D. Pérez-Morga, et E. Pays. 2001. « A Receptor-like Flagellar Pocket Glycoprotein Specific to Trypanosoma Brucei Gambiense ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 113 (1): 127-38. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(01)00208-0).
- Berriman, Matthew, Elodie Ghedin, Christiane Hertz-Fowler, Gaëlle Blandin, Hubert Renault, Daniella C. Bartholomeu, Nicola J. Lennard, et al. 2005. « The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei ». *Science* 309 (5733): 416-22. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>.
- Besteiro, Sébastien, Marc Biran, Nicolas Biteau, Virginie Coustou, Théo Baltz, Paul Canioni, et Frédéric Bringaud. 2002. « Succinate Secreted by Trypanosoma Brucei Is Produced by a Novel and Unique Glycosomal Enzyme, NADH-Dependent Fumarate Reductase ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (41): 38001-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201759200>.
- Billington, Karen, Clare Halliday, Ross Madden, Philip Dyer, Amy Rachel Barker, Flávia Fernandes Moreira-Leite, Mark Carrington, et al. 2023. « Genome-Wide Subcellular Protein Map for the Flagellate Parasite Trypanosoma Brucei ». *Nature Microbiology*, février. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01295-6>.
- Binns, Derk, Tom Januszewski, Yue Chen, Justin Hill, Vladislav S. Markin, Yingming Zhao, Christopher Gilpin, Kent D. Chapman, Richard G.W. Anderson, et Joel M. Goodman. 2006. « An intimate collaboration between peroxisomes and lipid bodies ». *The Journal of Cell Biology* 173 (5): 719-31. <https://doi.org/10.1083/jcb.200511125>.
- Boeszoermyeni, Andras, Harald Manuel Nagy, Haribabu Arthanari, Christoph Jens Pillip, Hanna Lindermuth, Rafael Eulogio Luna, Gerhard Wagner, Rudolf Zechner, Klaus Zangger, et Monika Oberer. 2015. « Structure of a CGI-58 Motif Provides the Molecular Basis of Lipid Droplet Anchoring ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (44): 26361-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.682203>.
- Bogatcheva, Natalia V., Marina G. Sergeeva, Steven M. Dudek, et Alexander D. Verin. 2005. « Arachidonic Acid Cascade in Endothelial Pathobiology ». *Microvascular Research* 69 (3): 107-27. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.01.007>.
- Bohnert, Maria, et Bianca Schrul. 2024. « Lipid Droplets in Health and Disease ». *FEBS Letters* 598 (10): 1113-15. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14900>.
- Bosch, Marta, Matthew J. Sweet, Robert G. Parton, et Albert Pol. 2021. « Lipid Droplets and the Host-Pathogen Dynamic: FATal Attraction? ». *The Journal of Cell Biology* 220 (8): e202104005. <https://doi.org/10.1083/jcb.202104005>.

- Boutant, Marie, Sameer S Kulkarni, Magali Joffraud, Joanna Ratajczak, Miriam Valera-Alberni, Roy Combe, Antonio Zorzano, et Carles Cantó. 2017. « Mfn2 is critical for brown adipose tissue thermogenic function ». *The EMBO Journal* 36 (11): 1543-58. <https://doi.org/10.15252/emj.201694914>.
- Bozza, Patricia T., Ilka Bakker-Abreu, Roberta A. Navarro-Xavier, et Christianne Bandeira-Melo. 2011. « Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update ». *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, Proceedings of the ISSFAL Congress 2010, 85 (5): 205-13. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020>.
- Bringaud, Frédéric, Loïc Rivière, et Virginie Coustou. 2006. « Energy Metabolism of Trypanosomatids: Adaptation to Available Carbon Sources ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.017>.
- Bruce, D. 1895. « Preliminary Report on Tsetse Fly Disease or Nagana in Zululand ». (*No Title*). <https://cir.nii.ac.jp/crid/1370846644339998337>.
- Bursell, E., K. J. C. Billing, J. W. Hargrove, C. T. McCabe, et Ella Slack. 1973. « The supply of substrates to the flight muscle of tsetse flies ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67 (2): 296. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(73\)90222-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(73)90222-8).
- Büscher, Philippe, Giuliano Cecchi, Vincent Jamonneau, et Gerardo Priotto. 2017. « Human African Trypanosomiasis ». *The Lancet* 390 (10110): 2397-2409. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31510-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31510-6).
- Caljon, Guy, Nick Van Reet, Carl De Trez, Marjorie Vermeersch, David Pérez-Morga, et Jan Van Den Abbeele. 2016. « The Dermis as a Delivery Site of Trypanosoma brucei for Tsetse Flies ». *PLoS Pathogens* 12 (7): e1005744. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005744>.
- Capewell, Paul, Anneli Cooper, Caroline Clucas, William Weir, et Annette Macleod. 2015. « A Co-Evolutionary Arms Race: Trypanosomes Shaping the Human Genome, Humans Shaping the Trypanosome Genome ». *Parasitology* 142 Suppl 1 (Suppl 1): S108-119. <https://doi.org/10.1017/S0031182014000602>.
- Capewell, Paul, Christelle Cren-Travaillé, Francesco Marchesi, Pamela Johnston, Caroline Clucas, Robert A Benson, Taylor-Anne Gorman, et al. 2016. « The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne African trypanosomes ». Édité par Photini Sinnis. *eLife* 5 (septembre):e17716. <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): e1287. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001287>.

- Carr, Rotonya M., Rajesh T. Patel, Vandana Rao, Ravindra Dhir, Mark J. Graham, Rosanne M. Crooke, et Rexford S. Ahima. 2012. « Reduction of TIP47 improves hepatic steatosis and glucose homeostasis in mice ». *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 302 (8): R996-1003. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00177.2011>.
- Casas-Godoy, Leticia, Francisco Gasteazoro, Sophie Duquesne, Florence Bordes, Alain Marty, et Georgina Sandoval. 2018. « Lipases: An Overview ». In *Lipases and Phospholipases*, édité par Georgina Sandoval, 1835:3-38. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_1.
- Catisti, R., S. A. Uyemura, R. Docampo, et A. E. Vercesi. 2000. « Calcium Mobilization by Arachidonic Acid in Trypanosomatids ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 105 (2): 261-71.
- Chang, Chi-Lun, Aubrey V. Weigel, Maria S. Ioannou, H. Amalia Pasolli, C. Shan Xu, David R. Peale, Gleb Shtengel, et al. 2019. « Spastin tethers lipid droplets to peroxisomes and directs fatty acid trafficking through ESCRT-III ». *Journal of Cell Biology* 218 (8): 2583-99. <https://doi.org/10.1083/jcb.201902061>.
- Charron, Audra J., et L. David Sibley. 2002. « Host Cells: Mobilizable Lipid Resources for the Intracellular Parasite *Toxoplasma Gondii* ». *Journal of Cell Science* 115 (Pt 15): 3049-59. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.15.3049>.
- Cho, Chung Hwan, Sanil Patel, et Prashant Rajbhandari. 2023. « Adipose tissue lipid metabolism: lipolysis ». *Current Opinion in Genetics & Development* 83 (décembre):102114. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2023.102114>.
- Choudhary, Vineet, Gonen Golani, Amit S. Joshi, Stéphanie Cottier, Roger Schneider, William A. Prinz, et Michael M. Kozlov. 2018. « Architecture of lipid droplets in endoplasmic reticulum is determined by phospholipid intrinsic curvature ». *Current biology : CB* 28 (6): 915-926.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.02.020>.
- Choudhary, Vineet, et Joel M. Goodman. 2023. « Editorial: The evolving role of lipid droplets: Advancements and future directions ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 11 (mars):1175083. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1175083>.
- Choudhary, Vineet, Namrata Ojha, Andy Golden, et William A. Prinz. 2015. « A conserved family of proteins facilitates nascent lipid droplet budding from the ER ». *Journal of Cell Biology* 211 (2): 261-71. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505067>.
- Chung, Jeeyun, Joongkyu Park, Zon Weng Lai, Talley J. Lambert, Ruth C. Richards, Jiuchun Zhang, Tobias C. Walther, et Robert V. Farese. 2023. « The Troyer Syndrome Protein Spartin Mediates Selective Autophagy of Lipid Droplets ». *Nature Cell Biology* 25 (8): 1101-10. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01178-w>.
- Chung, Jeeyun, Xudong Wu, Talley J. Lambert, Zon Weng Lai, Tobias C. Walther, et Robert V. Farese. 2019. « LDAF1 and Seipin Form a Lipid Droplet Assembly Complex ». *Developmental Cell* 51 (5): 551-563.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.10.006>.

- Coleman, Rosalind A. 2020. « The “Discovery” of Lipid Droplets: A Brief History of Organelles Hidden in Plain Sight ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1865 (9): 158762. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2020.158762>.
- Coppens, I, P Baudhuin, F R Opperdoes, et P J Courtoy. 1988. « Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (18): 6753-57. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.18.6753>.
- Coppens, I., F. R. Opperdoes, P. J. Courtoy, et P. Baudhuin. 1987. « Receptor-Mediated Endocytosis in the Bloodstream Form of *Trypanosoma Brucei*1 ». *The Journal of Protozoology* 34 (4): 465-73. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1987.tb03216.x>.
- Coustou, Virginie, Sébastien Besteiro, Marc Biran, Philippe Diolez, Véronique Bouchaud, Pierre Voisin, Paul A. M. Michels, Paul Canioni, Théo Baltz, et Frédéric Bringaud. 2003. « ATP Generation in the *Trypanosoma Brucei* Procyclic Form: CYTOSOLIC SUBSTRATE LEVEL PHOSPHORYLATION IS ESSENTIAL, BUT NOT OXIDATIVE PHOSPHORYLATION * ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (49): 49625-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307872200>.
- 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>.
- Coustou, Virginie, Nicolas Plazolles, Fabien Guegan, et Théo Baltz. 2012. « Sialidases Play a Key Role in Infection and Anaemia in *Trypanosoma Congolense* Animal Trypanosomiasis ». *Cellular Microbiology* 14 (3): 431-45. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01730.x>.
- Cox, Francis E. G. 2004. « History of sleeping sickness (African trypanosomiasis) ». *Infectious Disease Clinics of North America, Historical Aspects of Infectious Diseases, Part II*, 18 (2): 231-45. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.01.004>.
- Cross, George A. M., Hee-Sook Kim, et Bill Wickstead. 2014. « Capturing the Variant Surface Glycoprotein Repertoire (the VSGnome) of *Trypanosoma Brucei* Lister 427 ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 195 (1): 59-73. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.06.004>.
- Dass, Sheena, Serena Shunmugam, Laurence Berry, Christophe-Sebastien Arnold, Nicholas J. Katris, Samuel Duley, Fabien Pierrel, Marie-France Cesbron-Delauw, Yoshiki Yamaryo-Botté, et Cyrille Y. Botté. 2021. « *Toxoplasma* LIPIN Is Essential in Channeling Host Lipid Fluxes through Membrane Biogenesis and Lipid Storage ». *Nature Communications* 12 (1): 2813. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22956-w>.
- Dawoody Nejad, Ladan, Mauro Serricchio, Jennifer Jelk, Andrew Hemphill, et Peter Bütikofer. 2018. « TbLpn, a Key Enzyme in Lipid Droplet Formation and Phospholipid Metabolism, Is Essential for Mitochondrial Integrity and Growth of *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular Microbiology*, avril. <https://doi.org/10.1111/mmi.13976>.

- De Greef, Catherine, Hein Imberechts, Gaston Matthyssens, Nestor Van Meirvenne, et Raymond Hamers. 1989. « A gene expressed only in serum-resistant variants of *Trypanosoma brucei rhodesiense* ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 36 (2): 169-76. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(89\)90189-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(89)90189-8).
- Dennis, Edward A. 1994. « Diversity of Group Types, Regulation, and Function of Phospholipase A2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (18): 13057-60.
- Dennis, Edward A., Jian Cao, Yuan-Hao Hsu, Victoria Magrioti, et George Kokotos. 2011. « Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention ». *Chemical reviews* 111 (10): 6130-85. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>.
- Desquesnes, Marc, Marisa Gonzatti, Alireza Sazmand, Sophie Thévenon, Géraldine Bossard, Alain Boulangé, Geoffrey Gimonneau, et al. 2022. « A review on the diagnosis of animal trypanosomoses ». *Parasites & Vectors* 15 (1): 64. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05190-1>.
- Desquesnes, Marc, Alireza Sazmand, Marisa Gonzatti, Alain Boulangé, Géraldine Bossard, Sophie Thévenon, Geoffrey Gimonneau, et al. 2022. « Diagnosis of Animal Trypanosomoses: Proper Use of Current Tools and Future Prospects ». *Parasites & Vectors* 15 (1): 235. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05352-1>.
- Dhondt, S., P. Geoffroy, B. A. Stelmach, M. Legrand, et T. Heitz. 2000. « Soluble Phospholipase A2 Activity Is Induced before Oxylipin Accumulation in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco Leaves and Is Contributed by Patatin-like Enzymes ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 23 (4): 431-40. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00802.x>.
- Ding, Lianggong, Wenfei Sun, Miroslav Balaz, Anyuan He, Manuel Klug, Stefan Wieland, Robert Caiazzo, et al. 2021. « Peroxisomal β -Oxidation Acts as a Sensor for Intracellular Fatty Acids and Regulates Lipolysis ». *Nature Metabolism* 3 (12): 1648-61. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00489-2>.
- Dirkx, Ruud, Ilse Vanhorebeek, Katrin Martens, Arno Schad, Markus Grabenbauer, Dariush Fahimi, Peter Declercq, Paul P. Van Veldhoven, et Myriam Baes. 2005. « Absence of Peroxisomes in Mouse Hepatocytes Causes Mitochondrial and ER Abnormalities ». *Hepatology (Baltimore, Md.)* 41 (4): 868-78. <https://doi.org/10.1002/hep.20628>.
- Duan, Xiaowen, et David B. Savage. 2023. « The Role of Lipid Droplet Associated Proteins in Inherited Human Disorders ». *FEBS Letters*, novembre. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14779>.
- Eichmann, Thomas O., Manju Kumari, Joel T. Haas, Robert V. Farese, Robert Zimmermann, Achim Lass, et Rudolf Zechner. 2012. « Studies on the Substrate and Stereo/Regioselectivity of Adipose Triglyceride Lipase, Hormone-sensitive Lipase, and Diacylglycerol-O-acyltransferases ». *The Journal of Biological Chemistry* 287 (49): 41446-57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.400416>.
- Eintracht, J., R. Maathai, A. Mellors, et L. Ruben. 1998. « Calcium Entry in *Trypanosoma Brucei* Is Regulated by Phospholipase A2 and Arachidonic Acid ». *The Biochemical Journal* 336 (Pt 3) (décembre):659-66. <https://doi.org/10.1042/bj3360659>.

- Eisenberg-Bord, Michal, Muriel Mari, Uri Weill, Eden Rosenfeld-Gur, Ofer Moldavski, Inês G. Castro, Krishnakant G. Soni, et al. 2017. « Identification of seipin-linked factors that act as determinants of a lipid droplet subpopulation ». *Journal of Cell Biology* 217 (1): 269-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704122>.
- Emery, D. L., et S. K. Mooloo. 1981. « The Dynamics of the Cellular Reactions Elicited in the Skin of Goats by *Glossina morsitans morsitans* Infected with *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* or *T. (Duttonella) vivax* ». *Acta Tropica* 38 (1): 15-28.
- Farine, Luce, Jennifer Jelk, Jae-Yeon Choi, Dennis R. Voelker, Jon Nunes, Terry K. Smith, et Peter Bütikofer. 2017. « Phosphatidylserine synthase 2 and phosphatidylserine decarboxylase are essential for aminophospholipid synthesis in *Trypanosoma brucei* ». *Molecular Microbiology* 104 (3): 412-27. <https://doi.org/10.1111/mmi.13637>.
- Farine, Luce, Moritz Niemann, André Schneider, et Peter Bütikofer. 2015. « Phosphatidylethanolamine and Phosphatidylcholine Biosynthesis by the Kennedy Pathway Occurs at Different Sites in *Trypanosoma Brucei* ». *Scientific Reports* 5 (1): 16787. <https://doi.org/10.1038/srep16787>.
- Fei, Weihua, Guanghou Shui, Bruno Gaeta, Ximing Du, Lars Kuerschner, Peng Li, Andrew J. Brown, Markus R. Wenk, Robert G. Parton, et Hongyuan Yang. 2008. « Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast ». *The Journal of Cell Biology* 180 (3): 473-82. <https://doi.org/10.1083/jcb.200711136>.
- Fenn, Katelyn, et Keith R Matthews. 2007. « The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation ». *Current opinion in microbiology* 10 (6): 539-46. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.09.014>.
- Ferguson, M A, et G A Cross. 1984. « Myristylation of the membrane form of a *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. » *Journal of Biological Chemistry* 259 (5): 3011-15. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)43250-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43250-9).
- Ferguson, M. A., S. W. Homans, R. A. Dwek, et T. W. Rademacher. 1988. « Glycosyl-Phosphatidylinositol Moiety That Anchors *Trypanosoma Brucei* Variant Surface Glycoprotein to the Membrane ». *Science (New York, N.Y.)* 239 (4841 Pt 1): 753-59. <https://doi.org/10.1126/science.3340856>.
- Ferguson, M A, M G Low, et G A Cross. 1985. « Glycosyl-sn-1,2-dimyristylphosphatidylinositol is covalently linked to *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. » *Journal of Biological Chemistry* 260 (27): 14547-55. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)38603-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)38603-9).
- Field, M C, A K Menon, et G A Cross. 1991. « A glycosylphosphatidylinositol protein anchor from procyclic stage *Trypanosoma brucei*: lipid structure and biosynthesis. » *The EMBO Journal* 10 (10): 2731-39.
- Fiennes, R. N. T. W. 1950. « The Cattle Trypanosomiases: Some Considerations of Pathology and Immunity ». *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 44 (1): 42-54. <https://doi.org/10.1080/00034983.1950.11685428>.

- Fire, Andrew, SiQun Xu, Mary K. Montgomery, Steven A. Kostas, Samuel E. Driver, et Craig C. Mello. 1998. « Potent and Specific Genetic Interference by Double-Stranded RNA in *Caenorhabditis Elegans* ». *Nature* 391 (6669): 806-11. <https://doi.org/10.1038/35888>.
- Flaspohler, John A., Bryan C. Jensen, Tracy Saveria, Charles T. Kifer, et Marilyn Parsons. 2010. « A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes ». *Eukaryotic Cell* 9 (11): 1702-10. <https://doi.org/10.1128/EC.00106-10>.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2019. « Controlling tsetse and trypanosomiasis to protect African livestock keepers, public health and farmers' livelihoods ». 2019. <https://www.fao.org/documents/card/en/c/CA3887EN>.
- Franco, José R., Giuliano Cecchi, Gerardo Priotto, Massimo Paone, Abdoulaye Diarra, Lise Grout, Pere P. Simarro, Weining Zhao, et Daniel Argaw. 2020. « Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis at continental and country level: Update to 2018 ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (5): e0008261. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008261>.
- Fredrikson, G., H. Tornqvist, et P. Belfrage. 1986. « Hormone-Sensitive Lipase and Monoacylglycerol Lipase Are Both Required for Complete Degradation of Adipocyte Triacylglycerol ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 876 (2): 288-93. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(86\)90286-9](https://doi.org/10.1016/0005-2760(86)90286-9).
- Freyre, Christophe A. C., Pascal C. Rauher, Christer S. Ejsing, et Robin W. Klemm. 2019. « MIGA2 Links Mitochondria, the ER, and Lipid Droplets and Promotes De Novo Lipogenesis in Adipocytes ». *Molecular Cell* 76 (5): 811-825.e14. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.011>.
- Gambarotto, Davide, Fabian U. Zwettler, Maeva Le Guennec, Marketa Schmidt-Cernohorska, Denis Fortun, Susanne Borgers, Jörn Heine, et al. 2019. « Imaging Cellular Ultrastructures Using Expansion Microscopy (U-ExM) ». *Nature Methods* 16 (1): 71-74. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0238-1>.
- Gandotra, Sheetal, Koini Lim, Amandine Girusse, Vladimir Saudek, Stephen O'Rahilly, et David B. Savage. 2011. « Human Frame Shift Mutations Affecting the Carboxyl Terminus of Perilipin Increase Lipolysis by Failing to Sequester the Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) Coactivator AB-hydrolase-containing 5 (ABHD5) ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (40): 34998-6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.278853>.
- Gardiner, P. R. 1989. « Recent Studies of the Biology of *Trypanosoma vivax* ». In *Advances in Parasitology*, édité par J. R. Baker et R. Muller, 28:229-317. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60334-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60334-6).
- 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>.

- Giudicelli, H., N. Combes-Pastré, et J. Boyer. 1974. « Lipolytic Activity of Adipose Tissue. IV. The Diacylglycerol Lipase Activity of Human Adipose Tissue ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 369 (1): 25-33. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(74\)90188-x](https://doi.org/10.1016/0005-2760(74)90188-x).
- Goh, Vera J., Jolene S. Y. Tan, Bryan C. Tan, Colin Seow, Wei-Yi Ong, Yen Ching Lim, Lei Sun, Sujoy Ghosh, et David L. Silver. 2015. « Postnatal Deletion of Fat Storage-inducing Transmembrane Protein 2 (FIT2/FITM2) Causes Lethal Enteropathy ». *The Journal of Biological Chemistry* 290 (42): 25686-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.676700>.
- Gomes, Alessandra F, Kelly G Magalhães, Renata M Rodrigues, Laís de Carvalho, Raphael Molinaro, Patrícia T Bozza, et Helene S Barbosa. 2014. « Toxoplasma gondii-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2 ». *Parasites & Vectors* 7 (janvier):47. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-47>.
- Greenberg, A. S., J. J. Egan, S. A. Wek, N. B. Garty, E. J. Blanchette-Mackie, et C. Londos. 1991. « Perilipin, a Major Hormonally Regulated Adipocyte-Specific Phosphoprotein Associated with the Periphery of Lipid Storage Droplets ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (17): 11341-46.
- Gross, David A., Chenyang Zhan, et David L. Silver. 2011. « Direct binding of triglyceride to fat storage-inducing transmembrane proteins 1 and 2 is important for lipid droplet formation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (49): 19581-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110817108>.
- 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>.
- Guler, Jennifer L., Eva Kriegova, Terry K. Smith, Julius Lukeš, et Paul T. Englund. 2008. « Mitochondrial fatty acid synthesis is required for normal mitochondrial morphology and function in Trypanosoma brucei ». *Molecular microbiology* 67 (5): 1125-42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06112.x>.
- Gutiérrez, José María, et Bruno Lomonte. 2013. « Phospholipases A2: Unveiling the Secrets of a Functionally Versatile Group of Snake Venom Toxins ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 62 (février):27-39. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>.
- Haemmerle, Guenter, Robert Zimmermann, Marianne Hayn, Christian Theussl, Georg Waeg, Elke Wagner, Wolfgang Sattler, Thomas M. Magin, Erwin F. Wagner, et Rudolf Zechner. 2002. « Hormone-Sensitive Lipase Deficiency in Mice Causes Diglyceride Accumulation in Adipose Tissue, Muscle, and Testis ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (7): 4806-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110355200>.
- Hall, James P. J., Huanhuan Wang, et J. David Barry. 2013. « Mosaic VSGs and the Scale of Trypanosoma Brucei Antigenic Variation ». *PLoS Pathogens* 9 (7): e1003502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003502>.

- Henne, W Mike. 2023. « The (Social) Lives, Deaths, and Biophysical Phases of Lipid Droplets ». *Current Opinion in Cell Biology* 82 (juin):102178. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2023.102178>.
- Hervé, Perrine, Sarah Monic, Frédéric Bringaud, et Loïc Rivière. 2023. « Phospholipases A and Lysophospholipases in Protozoan Parasites ». *Microbial Cell (Graz, Austria)* 10 (10): 204-16. <https://doi.org/10.15698/mic2023.10.805>.
- Hoare, Cecil A. 1964. « Morphological and Taxonomic Studies on Mammalian Trypanosomes. X. Revision of the Systematics ». *The Journal of Protozoology* 11 (2): 200-207. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1964.tb01741.x>.
- Hong, Z., J. Adlakha, N. Wan, E. Guinn, F. Giska, K. Gupta, T.J. Melia, et K.M. Reinisch. 2022. « Mitoguardin-2-Mediated Lipid Transfer Preserves Mitochondrial Morphology and Lipid Droplet Formation ». *Journal of Cell Biology* 221 (12). <https://doi.org/10.1083/jcb.202207022>.
- Hugenroth, Marie, et Maria Bohnert. 2020. « Come a little bit closer! Lipid droplet-ER contact sites are getting crowded ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1867 (2): 118603. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.118603>.
- Hutchinson, Sebastian, Lucy Glover, et David Horn. 2016. « High-resolution analysis of multi-copy variant surface glycoprotein gene expression sites in African trypanosomes ». *BMC Genomics* 17 (octobre):806. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3154-8>.
- Jackson, Andrew P., Andrew Berry, Martin Aslett, Harriet C. Allison, Peter Burton, Jana Vavrova-Anderson, Robert Brown, et al. 2012. « Antigenic diversity is generated by distinct evolutionary mechanisms in African trypanosome species ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (9): 3416-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117313109>.
- 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): e0003975. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003975>.
- Jackson, Katherine E., Nectarios Klonis, David J. P. Ferguson, Akinola Adisa, Con Dogovski, et Leann Tilley. 2004. « Food Vacuole-Associated Lipid Bodies and Heterogeneous Lipid Environments in the Malaria Parasite, Plasmodium Falciparum ». *Molecular Microbiology* 54 (1): 109-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04284.x>.
- Jacquier, Nicolas, Vineet Choudhary, Muriel Mari, Alexandre Toulmay, Fulvio Reggiori, et Roger Schneider. 2011. « Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae ». *Journal of Cell Science* 124 (14): 2424-37. <https://doi.org/10.1242/jcs.076836>.
- Jain, Amrita, et Joost C. M. Holthuis. 2017. « Membrane Contact Sites, Ancient and Central Hubs of Cellular Lipid Logistics ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864 (9): 1450-58. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.05.017>.

- Jiang, D. W., et P. T. Englund. 2001. « Four Trypanosoma Brucei Fatty Acyl-CoA Synthetases: Fatty Acid Specificity of the Recombinant Proteins ». *The Biochemical Journal* 358 (Pt 3): 757-61. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3580757>.
- Joshi, A.S., B. Nebenfuhr, V. Choudhary, P. Satpute-Krishnan, T.P. Levine, A. Golden, et W.A. Prinz. 2018. « Lipid Droplet and Peroxisome Biogenesis Occur at the Same ER Subdomains ». *Nature Communications* 9 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05277-3>.
- Kadereit, Bert, Pradeep Kumar, Wen-Jun Wang, Diego Miranda, Erik L. Snapp, Nadia Severina, Ingrid Torregroza, Todd Evans, et David L. Silver. 2008. « Evolutionarily conserved gene family important for fat storage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (1): 94-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708579105>.
- Karanasios, Eleftherios, Antonio Daniel Barbosa, Hiroshi Sembongi, Muriel Mari, Gil-Soo Han, Fulvio Reggiori, George M. Carman, et Symeon Sinioglou. 2013. « Regulation of lipid droplet and membrane biogenesis by the acidic tail of the phosphatidate phosphatase Pah1p ». *Molecular Biology of the Cell* 24 (13): 2124-33. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-01-0021>.
- Kasozi, Keneth Iceland, Ewan Thomas MacLeod, et Susan Christina Welburn. 2023. « African animal trypanocide resistance: A systematic review and meta-analysis ». *Frontiers in Veterinary Science* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.950248>.
- Kien, Benedikt, Stephanie Kolleritsch, Natalia Kunowska, Christoph Heier, Gabriel Chalhoub, Anna Tilp, Heimo Wolinski, Ulrich Stelzl, et Guenter Haemmerle. 2022. « Lipid droplet-mitochondria coupling via perilipin 5 augments respiratory capacity but is dispensable for FA oxidation ». *Journal of Lipid Research* 63 (3): 100172. <https://doi.org/10.1016/j.jlr.2022.100172>.
- Kim, H., S. Lee, Y. Jun, et C. Lee. 2022. « Structural Basis for Mitoguardin-2 Mediated Lipid Transport at ER-Mitochondrial Membrane Contact Sites ». *Nature Communications* 13 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31462-6>.
- Kim, Siyoung, Myong In Oh, et Jessica M. J. Swanson. 2021. « Stressed Lipid Droplets: How Neutral Lipids Relieve Surface Tension and Membrane Expansion Drives Protein Association ». *The journal of physical chemistry. B* 125 (21): 5572-86. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c01795>.
- Kimmel, Alan R., et Carole Sztalryd. 2014. « Perilipin 5, a Lipid Droplet Protein Adapted to Mitochondrial Energy Utilization ». *Current Opinion in Lipidology* 25 (2): 110. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000057>.
- Klug, Y.A., J.C. Deme, R.A. Corey, M.F. Renne, P.J. Stansfeld, S.M. Lea, et P. Carvalho. 2021. « Mechanism of Lipid Droplet Formation by the Yeast Sei1/Ldb16 Seipin Complex ». *Nature Communications* 12 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26162-6>.
- Kono, Nozomu, et Hiroyuki Arai. 2019. « Platelet-Activating Factor Acetylhydrolases: An Overview and Update ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864 (6): 922-31. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.07.006>.

- Kory, Nora, Robert V. Farese, et Tobias C. Walther. 2016. « Targeting Fat: Mechanisms of Protein Localization to Lipid Droplets ». *Trends in cell biology* 26 (7): 535-46. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.02.007>.
- Kory, Nora, Abdou-Rachid Thiam, Robert V. Farese, et Tobias C. Walther. 2015. « Protein Crowding Is a Determinant of Lipid Droplet Protein Composition ». *Developmental Cell* 34 (3): 351-63. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.06.007>.
- Krafsur, E. S. 2009. « Tsetse flies: Genetics, evolution, and role as vectors ». *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9 (1): 124-41. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.09.010>.
- Krayem, Najeh, et Youssef Gargouri. 2020. « Scorpion Venom Phospholipases A2: A Minireview ». *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology* 184 (septembre):48-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.05.020>.
- Krinsky, William L. 2019. « Chapter 18 - Tsetse Flies (Glossinidae) ». In *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)*, édité par Gary R. Mullen et Lance A. Durden, 369-82. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00018-2>.
- Ku, Bonsu, Kwang-Hoon Lee, Wei Sun Park, Chul-Su Yang, Jianning Ge, Seong-Gyu Lee, Sun-Shin Cha, et al. 2012. « VipD of Legionella pneumophila Targets Activated Rab5 and Rab22 to Interfere with Endosomal Trafficking in Macrophages ». *PLoS Pathogens* 8 (12): e1003082. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003082>.
- Kubata, Bruno Kilunga, Michael Duszenko, Zakayi Kabututu, Marc Rawer, Alexander Szallies, Ko Fujimori, Takashi Inui, et al. 2000. « Identification of a Novel Prostaglandin F2 α Synthase in Trypanosoma brucei ». *The Journal of Experimental Medicine* 192 (9): 1327-38.
- Kuboki, Noritaka, Noboru Inoue, Tatsuya Sakurai, Francescopaolo Di Cello, Dennis J. Grab, Hiroshi Suzuki, Chihiro Sugimoto, et Ikuo Igarashi. 2003. « Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes ». *Journal of Clinical Microbiology* 41 (12): 5517-24. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5517-5524.2003>.
- Kulminskaya, Natalia, et Monika Oberer. 2020. « Protein-protein interactions regulate the activity of Adipose Triglyceride Lipase in intracellular lipolysis ». *Biochimie, Biogenesis and Fate of Lipid Droplets*, guest edited by Dr Frédéric Carrière and Yonghua Li-Beisson, 169 (février):62-68. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.08.004>.
- Lafontan, Max, et Dominique Langin. 2009. « Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue ». *Progress in Lipid Research* 48 (5): 275-97. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.05.001>.
- Lai, De-Hua, Hassan Hashimi, Zhao-Rong Lun, Francisco J. Ayala, et Julius Lukeš. 2008. « Adaptations of Trypanosoma brucei to gradual loss of kinetoplast DNA: Trypanosoma equiperdum and Trypanosoma evansi are petite mutants of T. brucei ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6): 1999-2004. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711799105>.

- Lamour, Nadia, Loïc Rivière, Virginie Coustou, Graham H. Coombs, Michael P. Barrett, et Frédéric Bringaud. 2005. « Proline Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei* Is Down-regulated in the Presence of Glucose* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 11902-10. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414274200>.
- Langousis, Gerasimos, et Kent L. Hill. 2014. « Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei* ». *Nature reviews. Microbiology* 12 (7): 505-18. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3274>.
- Laporte, Marine H., Éloïse Bertiaux, Virginie Hamel, et Paul Guichard. 2023. « [Closer to the native architecture of the cell using Cryo-ExM] ». *Medecine Sciences: M/S* 39 (4): 351-58. <https://doi.org/10.1051/medsci/2023052>.
- Laporte, Marine H., Nikolai Klena, Virginie Hamel, et Paul Guichard. 2022. « Visualizing the Native Cellular Organization by Coupling Cryofixation with Expansion Microscopy (Cryo-ExM) ». *Nature Methods* 19 (2): 216-22. <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01356-4>.
- Leak, Stephen G. A. 1998. *Tsetse Biology and Ecology: Their Role in the Epidemiology and Control of Trypanosomosis*. ILRI (aka ILCA and ILRAD).
- Lecoeur, Hervé, Emilie Giraud, Marie-Christine Prévost, Geneviève Milon, et Thierry Lang. 2013. « Reprogramming Neutral Lipid Metabolism in Mouse Dendritic Leucocytes Hosting Live *Leishmania amazonensis* Amastigotes ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (6): e2276. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002276>.
- Lee, J, Kai Matuschewski, Giel van Dooren, Alexander G. Maier, et Melanie Rug. 2024. « Lipid Droplet Dynamics Are Essential for the Development of the Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* ». *Journal of Cell Science*, avril. <https://doi.org/10.1242/jcs.262162>.
- Lee, Soo Hee, Jennifer L. Stephens, Kimberly S. Paul, et Paul T. Englund. 2006. « Fatty Acid Synthesis by Elongases in Trypanosomes ». *Cell* 126 (4): 691-99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.045>.
- Liao, Pin-Chao, Emily J. Yang, Taylor Borgman, Istvan R. Boldogh, Cierra N. Sing, Theresa C. Swayne, et Liza A. Pon. 2022. « Touch and Go: Membrane Contact Sites Between Lipid Droplets and Other Organelles ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852021>.
- Lige, Bao, Vera Sampels, et Isabelle Coppens. 2013. « Characterization of a second sterol-esterifying enzyme in *Toxoplasma* highlights the importance of cholesterol storage pathways for the parasite ». *Molecular microbiology* 87 (5): 951-67. <https://doi.org/10.1111/mmi.12142>.
- Lillico, Simon, Mark C. Field, Pat Blundell, Graham H. Coombs, et Jeremy C. Mottram. 2003. « Essential Roles for GPI-anchored Proteins in African Trypanosomes Revealed Using Mutants Deficient in GPI8 ». *Molecular Biology of the Cell* 14 (3): 1182-94. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-03-0167>.

- Lindner, Andreas K, Veerle Lejon, François Chappuis, Jorge Seixas, Leon Kazumba, Michael P Barrett, Erick Mwamba, et al. 2020. « New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice ». *The Lancet Infectious Diseases* 20 (2): e38-46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30612-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30612-7).
- Liu, Beiyu, Yanan Liu, Shawn A. Motyka, Eddy E. C. Agbo, et Paul T. Englund. 2005. « Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA ». *Trends in Parasitology* 21 (8): 363-69. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.06.008>.
- Lizaso, Analyn, Kien-Thiam Tan, et Ying-Hue Lee. 2013. « β -adrenergic receptor-stimulated lipolysis requires the RAB7-mediated autolysosomal lipid degradation ». *Autophagy* 9 (8): 1228-43. <https://doi.org/10.4161/auto.24893>.
- Losos, G. J., J. Paris, A. J. Wilson, et F. K. Dar. 1973. « Distribution of *Trypanosoma Congolense* in Tissues of Cattle ». *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 67 (2): 278. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(73\)90193-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(73)90193-4).
- Lueong, Smiths, Clementine Merce, Bernd Fischer, Jörg D. Hoheisel, et Esteban D. Erben. 2016. « Gene Expression Regulatory Networks in *Trypanosoma Brucei*: Insights into the Role of the mRNA-Binding Proteome ». *Molecular Microbiology* 100 (3): 457-71. <https://doi.org/10.1111/mmi.13328>.
- Lulić, Ana-Marija, et Maja Katalinić. 2023. « The PNPLA Family of Enzymes: Characterisation and Biological Role ». *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 74 (2): 75-89. <https://doi.org/10.2478/aiht-2023-74-3723>.
- Macedo-Silva, Sara Teixeira de, Thais Larissa Araújo de Oliveira Silva, Julio A. Urbina, Wanderley de Souza, et Juliany Cola Fernandes Rodrigues. 2011. « Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania Amazonensis* ». *Molecular Biology International* 2011:876021. <https://doi.org/10.4061/2011/876021>.
- Machado, Henrique, Peter Hofer, Rudolf Zechner, Terry K. Smith, et Luísa M. Figueiredo. 2023. « Adipocyte Lipolysis Protects Mice against *Trypanosoma Brucei* Infection ». *Nature Microbiology*, octobre. <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01496-7>.
- Magez, Stefan, Joar Esteban Pinto Torres, Seoyeon Oh, et Magdalena Radwanska. 2021. « Salivarian Trypanosomes Have Adopted Intricate Host-Pathogen Interaction Mechanisms That Ensure Survival in Plain Sight of the Adaptive Immune System ». *Pathogens (Basel, Switzerland)* 10 (6): 679. <https://doi.org/10.3390/pathogens10060679>.
- Magré, J., M. Delépine, E. Khallouf, T. Gedde-Dahl, L. Van Maldergem, E. Sobel, J. Papp, et al. 2001. « Identification of the Gene Altered in Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy on Chromosome 11q13 ». *Nature Genetics* 28 (4): 365-70. <https://doi.org/10.1038/ng585>.
- Matthews, K. R., C. Tschudi, et E. Ullu. 1994. « A Common Pyrimidine-Rich Motif Governs Trans-Splicing and Polyadenylation of Tubulin Polycistronic Pre-mRNA in Trypanosomes ». *Genes & Development* 8 (4): 491-501. <https://doi.org/10.1101/gad.8.4.491>.

- Mazet, Muriel, Pauline Morand, Marc Biran, Guillaume Bouyssou, Pierrette Courtois, Sylvie Daulouède, Yoann Millerioux, et al. 2013. « Revisiting the Central Metabolism of the Bloodstream Forms of *Trypanosoma brucei*: Production of Acetate in the Mitochondrion Is Essential for Parasite Viability ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (12): e2587. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002587>.
- McDonald, Lindsay, Mathieu Cayla, Alasdair Ivens, Binny M. Mony, Paula MacGregor, Eleanor Silvester, Kirsty McWilliam, et Keith R. Matthews. 2018. « Non-linear hierarchy of the quorum sensing signalling pathway in bloodstream form African trypanosomes ». *PLoS Pathogens* 14 (6): e1007145. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007145>.
- McKean, Paul G. 2003. « Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei* ». *Current Opinion in Microbiology* 6 (6): 600-607. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.010>.
- Melo, Rossana C. N., Heloisa D'Avila, Hsiao-Ching Wan, Patrícia T. Bozza, Ann M. Dvorak, et Peter F. Weller. 2011. « Lipid Bodies in Inflammatory Cells ». *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 59 (5): 540-56. <https://doi.org/10.1369/0022155411404073>.
- Melville, S. E., V. Leech, C. S. Gerrard, A. Tait, et J. M. Blackwell. 1998. « The Molecular Karyotype of the Megabase Chromosomes of *Trypanosoma Brucei* and the Assignment of Chromosome Markers ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 94 (2): 155-73. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(98\)00054-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(98)00054-1).
- Mendes, Edevi Arbonelli, Vânia Cristina Desoti, Sueli de Oliveira Silva, Tânia Ueda-Nakamura, Benedito Prado Dias Filho, Sueli Fumie Yamada-Ogatta, Maria Helena Sarragiotto, et Celso Vataru Nakamura. 2016. « C5 Induces Different Cell Death Pathways in Promastigotes of *Leishmania Amazonensis* ». *Chemico-Biological Interactions* 256 (août):16-24. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.018>.
- Mesu, Victor Kande Betu Ku, Wilfried Mutombo Kalonji, Clélia Bardonneau, Olaf Valverde Mordt, Séverine Blesson, François Simon, Sophie Delhomme, et al. 2018. « Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial ». *The Lancet* 391 (10116): 144-54. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32758-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7).
- Millerioux, Yoann, Charles Ebikeme, Marc Biran, Pauline Morand, Guillaume Bouyssou, Isabel M. Vincent, Muriel Mazet, et al. 2013. « The Threonine Degradation Pathway of the *Trypanosoma Brucei* Procyclic Form: The Main Carbon Source for Lipid Biosynthesis Is under Metabolic Control ». *Molecular Microbiology* 90 (1): 114-29. <https://doi.org/10.1111/mmi.12351>.
- Millerioux, Yoann, Muriel Mazet, Guillaume Bouyssou, Stefan Allmann, Tiila-Riikka Kiema, Eloïse Bertiaux, Laetitia Fouillen, et al. 2018. « De Novo Biosynthesis of Sterols and Fatty Acids in the *Trypanosoma Brucei* Procyclic Form: Carbon Source Preferences and Metabolic Flux Redistributions ». *PLoS Pathogens* 14 (5): e1007116. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007116>.

- Monteiro-Cardoso, Vera Filipa, et Francesca Giordano. 2024. « Emerging Functions of the Mitochondria-ER-Lipid Droplet Three-Way Junction in Coordinating Lipid Transfer, Metabolism, and Storage in Cells ». *FEBS Letters*, mai. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.14893>.
- Morel, Chloé Alexandra, Corinne Asencio, Corinne Blancard, Bénédicte Salin, Etienne Gontier, Stéphane Duvezin-Caubet, Manuel Rojo, Frédéric Bringaud, et Emmanuel Tetaud. 2023. « Identification of a Novel and Ancestral Machinery Involved in Mitochondrial Membrane Branching in *Trypanosoma Brucei* ». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.06.28.546890>.
- Morita, Yasu S., Kimberly S. Paul, et Paul T. Englund. 2000. « Specialized Fatty Acid Synthesis in African Trypanosomes: Myristate for GPI Anchors ». *Science* 288 (5463): 140-43. <https://doi.org/10.1126/science.288.5463.140>.
- Mowatt, M R, et C E Clayton. 1987. « Developmental regulation of a novel repetitive protein of *Trypanosoma brucei*. » *Molecular and Cellular Biology* 7 (8): 2838-44.
- Mowatt, M. R., G. S. Wisdom, et C. E. Clayton. 1989. « Variation of Tandem Repeats in the Developmentally Regulated Procyclic Acidic Repetitive Proteins of *Trypanosoma Brucei* ». *Molecular and Cellular Biology* 9 (3): 1332-35. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.3.1332-1335.1989>.
- Navarro, Miguel, et Keith Gull. 2001. « A Pol I Transcriptional Body Associated with VSG Mono-Allelic Expression in *Trypanosoma Brucei* ». *Nature* 414 (6865): 759-63. <https://doi.org/10.1038/414759a>.
- Nevalainen, Timo J., Heikki J. Peuravuori, Ronald J. Quinn, Lyndon E. Llewellyn, John A. H. Benzie, Peter J. Fenner, et Ken D. Winkel. 2004. « Phospholipase A2 in Cnidaria ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology* 139 (4): 731-35. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.09.006>.
- Ngô, H., C. Tschudi, K. Gull, et E. Ullu. 1998. « Double-Stranded RNA Induces mRNA Degradation in *Trypanosoma Brucei* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25): 14687-92. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14687>.
- Nishikawa, Yoshifumi, Friederike Quittnat, Timothy T. Stedman, Dennis R. Voelker, Jae-Yeon Choi, Matt Zahn, Mei Yang, Marc Pypaert, Keith A. Joiner, et Isabelle Coppens. 2005. « Host Cell Lipids Control Cholesteryl Ester Synthesis and Storage in Intracellular *Toxoplasma* ». *Cellular Microbiology* 7 (6): 849-67. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00518.x>.
- Nolan, Sabrina J., Julia D. Romano, et Isabelle Coppens. 2017. « Host Lipid Droplets: An Important Source of Lipids Salvaged by the Intracellular Parasite *Toxoplasma Gondii* ». *PLoS Pathogens* 13 (6): e1006362. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006362>.
- Nolan, Sabrina J., Julia D. Romano, John T. Kline, et Isabelle Coppens. 2018. « Novel Approaches To Kill *Toxoplasma gondii* by Exploiting the Uncontrolled Uptake of Unsaturated Fatty Acids and Vulnerability to Lipid Storage Inhibition of the Parasite ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62 (10): e00347-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00347-18>.

- Oelkers, P., A. Behari, D. Cromley, J. T. Billheimer, et S. L. Sturley. 1998. « Characterization of Two Human Genes Encoding Acyl Coenzyme A:Cholesterol Acyltransferase-Related Enzymes ». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (41): 26765-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.41.26765>.
- Olarte, Maria-Jesus, Siyoung Kim, Morris E. Sharp, Jessica M.J. Swanson, Robert V. Farese, et Tobias C. Walther. 2020. « Determinants of endoplasmic reticulum-to-lipid droplet protein targeting ». *Developmental cell* 54 (4): 471-487.e7. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.001>.
- Olarte, Maria-Jesus, Jessica M.J. Swanson, Tobias C. Walther, et Robert V. Farese. 2022. « The CYTOLD and ERTOLD pathways for lipid droplet–protein targeting ». *Trends in biochemical sciences* 47 (1): 39-51. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.08.007>.
- Olzmann, James A., et Pedro Carvalho. 2019. « Dynamics and functions of lipid droplets ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 20 (3): 137-55. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0085-z>.
- 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):115. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00115>.
- Opperdoes, F. R. 1987. « Compartmentation of Carbohydrate Metabolism in Trypanosomes ». *Annual Review of Microbiology* 41:127-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.001015>.
- Opperdoes, Fred R., et Piet Borst. 1977. « Localization of Nine Glycolytic Enzymes in a Microbody-like Organelle in Trypanosoma Brucei: The Glycosome ». *FEBS Letters* 80 (2): 360-64. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(77\)80476-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(77)80476-6).
- Pandey, Amit V., Vinod K. Babbarwal, Jude N. Okoyeh, Ratan M. Joshi, Sunil K. Puri, Ram L. Singh, et Virander S. Chauhan. 2003. « Hemozoin Formation in Malaria: A Two-Step Process Involving Histidine-Rich Proteins and Lipids ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308 (4): 736-43. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01465-7](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01465-7).
- Parreira de Aquino, Giovana, Marco Antonio Mendes Gomes, Roberto Köpke Salinas, et Maria Fernanda Laranjeira-Silva. 2021. « Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids ». *Microbial Cell* 8 (11): 262-75. <https://doi.org/10.15698/mic2021.11.764>.
- Paul, K. S., D. Jiang, Y. S. Morita, et P. T. Englund. 2001. « Fatty Acid Synthesis in African Trypanosomes: A Solution to the Myristate Mystery ». *Trends in Parasitology* 17 (8): 381-87. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)01984-5](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)01984-5).
- Pays, Etienne, Benoit Vanhollebeke, 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>.

- Pereira, Miria G., Gonzalo Visbal, Tatiana F. R. Costa, Susana Frases, Wanderley de Souza, Geórgia Atella, et Narcisa Cunha-e-Silva. 2018. « Trypanosoma cruzi epimastigotes store cholesteryl esters in lipid droplets after cholesterol endocytosis ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 224 (septembre):6-16. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.004>.
- Pérez-Morga, David, Benoit Vanhollebeke, Françoise Paturiaux-Hanocq, Derek P. Nolan, Laurence Lins, Fabrice Homblé, Luc Vanhamme, et al. 2005. « Apolipoprotein L-I Promotes Trypanosome Lysis by Forming Pores in Lysosomal Membranes ». *Science (New York, N.Y.)* 309 (5733): 469-72. <https://doi.org/10.1126/science.1114566>.
- Peterson, Clark W. H., Kirandeep K. Deol, Milton To, et James A. Olzmann. 2021. « Optimized Protocol for the Identification of Lipid Droplet Proteomes Using Proximity Labeling Proteomics in Cultured Human Cells ». *STAR Protocols* 2 (2): 100579. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100579>.
- Pidoux, G., O. Witczak, E. Jarnss, L. Myrvold, H. Urlaub, A.J. Stokka, T. Küntziger, et K. Taskén. 2011. « Optic Atrophy 1 Is an A-Kinase Anchoring Protein on Lipid Droplets That Mediates Adrenergic Control of Lipolysis ». *EMBO Journal* 30 (21): 4371-86. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.365>.
- Poudyal, Nava Raj, et Kimberly S. Paul. 2022. « Fatty acid uptake in Trypanosoma brucei: Host resources and possible mechanisms ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12 (novembre):949409. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.949409>.
- Prévost, Coline, Morris E. Sharp, Nora Kory, Qingqing Lin, Gregory A. Voth, Robert V. Farese, et Tobias C. Walther. 2018. « Mechanism and Determinants of Amphipathic Helix-Containing Protein Targeting to Lipid Droplets ». *Developmental cell* 44 (1): 73-86.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.011>.
- Priotto, Gerardo, Jose R Franco, Veerle Lejon, Philippe Büscher, Enock Matovu, Joseph Ndung'u, Sylvain Biéler, et al. 2023. « Target product profile: diagnostic test for Trypanosoma brucei rhodesiense ». *Bulletin of the World Health Organization* 101 (8): 529-34. <https://doi.org/10.2471/BLT.23.290173>.
- Pszenny, Viviana, Karen Ehrenman, Julia D. Romano, Andrea Kennard, Aric Schultz, David S. Roos, Michael E. Grigg, Vern B. Carruthers, et Isabelle Coppens. 2016. « A Lipolytic Lecithin:Cholesterol Acyltransferase Secreted by Toxoplasma Facilitates Parasite Replication and Egress ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (8): 3725-46. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671974>.
- Pu, Maomao, Wenhui Zheng, Hongtao Zhang, Wei Wan, Chao Peng, Xuebo Chen, Xinchang Liu, et al. 2023. « ORP8 Acts as a Lipophagy Receptor to Mediate Lipid Droplet Turnover ». *Protein & Cell* 14 (9): 653-67. <https://doi.org/10.1093/procel/pwac063>.
- Pulido-Méndez, M., H. J. Finol, M. E. Girón, et I. Aguilar. 2006. « Ultrastructural Pathological Changes in Mice Kidney Caused by Plasmodium Berghei Infection ». *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 38 (2-3): 143-48.

- Quittnat, Friederike, Yoshifumi Nishikawa, Timothy T. Stedman, Dennis R. Voelker, Jae-Yeon Choi, Matthew M. Zahn, Robert C. Murphy, et al. 2004. « On the Biogenesis of Lipid Bodies in Ancient Eukaryotes: Synthesis of Triacylglycerols by a Toxoplasma DGAT1-Related Enzyme ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 138 (1): 107-22. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.08.004>.
- Rabhi, Imen, Sameh Rabhi, Rym Ben-Othman, Axel Rasche, Adriani Daskalaki, Bernadette Trentin, David Piquemal, Béatrice Regnault, Albert Descoteaux, et Lamia Guizani-Tabbane. 2012. « Transcriptomic Signature of Leishmania Infected Mice Macrophages: A Metabolic Point of View ». *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6 (8): e1763. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001763>.
- Rabhi, Sameh, Imen Rabhi, Bernadette Trentin, David Piquemal, Béatrice Regnault, Sophie Goyard, Thierry Lang, Albert Descoteaux, Jost Enninga, et Lamia Guizani-Tabbane. 2016. « Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during Leishmania major Macrophage Infection ». *PLoS ONE* 11 (2): e0148640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148640>.
- Racusen, David, et Murray Foote. 1980. « A Major Soluble Glycoprotein of Potato Tubers ». *Journal of Food Biochemistry* 4 (1): 43-52. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1980.tb00876.x>.
- Radwanska, Magdalena, Nick Vereecke, Violette Deleeuw, Joar Pinto, et Stefan Magez. 2018. « Salivarian Trypanosomosis: A Review of Parasites Involved, Their Global Distribution and Their Interaction With the Innate and Adaptive Mammalian Host Immune System ». *Frontiers in Immunology* 9:2253. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02253>.
- Rahman, M. Sayeedur, Nicole C. Ammerman, Khandra T. Sears, Shane M. Ceraul, et Abdu F. Azad. 2010. « Functional Characterization of a Phospholipase A2 Homolog from Rickettsia typhi ». *Journal of Bacteriology* 192 (13): 3294-3303. <https://doi.org/10.1128/JB.00155-10>.
- Richardson, J. P., R. P. Beecroft, D. L. Tolson, M. K. Liu, et T. W. Pearson. 1988. « Procyclin: An Unusual Immunodominant Glycoprotein Surface Antigen from the Procyclic Stage of African Trypanosomes ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 31 (3): 203-16. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(88\)90150-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(88)90150-8).
- Richmond, Gregory S., et Terry K. Smith. 2011. « Phospholipases A1 ». *International Journal of Molecular Sciences* 12 (1): 588-612. <https://doi.org/10.3390/ijms12010588>.
- Ridgley, E. L., et L. 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.
- Rivière, Loïc, Patrick Moreau, Stefan Allmann, Matthias Hahn, Marc Biran, Nicolas Plazolles, Jean-Michel Franconi, Michael Boshart, et Frédéric Bringaud. 2009. « Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12694-99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903355106>.

- Robenek, Horst, Oliver Hofnagel, Insa Buers, Mirko J. Robenek, David Troyer, et Nicholas J. Severs. 2006. « Adipophilin-Enriched Domains in the ER Membrane Are Sites of Lipid Droplet Biogenesis ». *Journal of Cell Science* 119 (Pt 20): 4215-24. <https://doi.org/10.1242/jcs.03191>.
- Roberts, Larry, Gerald D. Schmidt, et Jr Janovy John. 2009. *Foundations of Parasitology*. McGraw-Hill Education.
- Robichaud, Sabrina, Garrett Fairman, Viyashini Vijithakumar, Esther Mak, David P. Cook, Alexander R. Pelletier, Sylvain Huard, et al. 2021. « Identification of novel lipid droplet factors that regulate lipophagy and cholesterol efflux in macrophage foam cells ». *Autophagy* 17 (11): 3671-89. <https://doi.org/10.1080/15548627.2021.1886839>.
- Robinson, D. R., T. Sherwin, A. Ploubidou, E. H. Byard, et K. Gull. 1995. « Microtubule Polarity and Dynamics in the Control of Organelle Positioning, Segregation, and Cytokinesis in the Trypanosome Cell Cycle ». *The Journal of Cell Biology* 128 (6): 1163-72. <https://doi.org/10.1083/jcb.128.6.1163>.
- Roditi, I., M. Carrington, et M. Turner. 1987. « Expression of a Polypeptide Containing a Dipeptide Repeat Is Confined to the Insect Stage of Trypanosoma Brucei ». *Nature* 325 (6101): 272-74. <https://doi.org/10.1038/325272a0>.
- Rodríguez-Acosta, A., H. J. Finol, M. Pulido-Méndez, A. Márquez, G. Andrade, N. González, I. Aguilar, M. E. Girón, et A. Pinto. 1998. « Liver Ultrastructural Pathology in Mice Infected with Plasmodium Berghei ». *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 30 (2): 299-307.
- Rohrer, Susan Pietrzak, Emil F. Michelotti, Al F. Torri, et Stephen L. Hajduk. 1987. « Transcription of kinetoplast DNA minicircles ». *Cell* 49 (5): 625-32. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90538-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90538-1).
- 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 (1-2): 306-317.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.041>.
- Rotureau, Brice, et Jan Van Den Abbeele. 2013. « Through the dark continent: African trypanosome development in the tsetse fly ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00053>.
- Salo, Veijo T, Ilya Belevich, Shiqian Li, Leena Karhinen, Helena Vihinen, Corinne Vigouroux, Jocelyne Magré, et al. 2016. « Seipin regulates ER–lipid droplet contacts and cargo delivery ». *The EMBO Journal* 35 (24): 2699-2716. <https://doi.org/10.15252/embj.201695170>.
- Salo, Veijo T., Shiqian Li, Helena Vihinen, Maarit Hölttä-Vuori, Abel Szkalitsy, Peter Horvath, Ilya Belevich, et al. 2019. « Seipin Facilitates Triglyceride Flow to Lipid Droplet and Counteracts Droplet Ripening via Endoplasmic Reticulum Contact ». *Developmental Cell* 50 (4): 478-493.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.016>.

- Santos, Herbert J., et Tomoyoshi Nozaki. 2021. « Interorganellar communication and membrane contact sites in protozoan parasites ». *Parasitology International* 83 (août):102372. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102372>.
- Sawa, Teiji, Saeko Hamaoka, Mao Kinoshita, Atsushi Kainuma, Yoshifumi Naito, Koichi Akiyama, et Hideya Kato. 2016. « Pseudomonas Aeruginosa Type III Secretory Toxin ExoU and Its Predicted Homologs ». *Toxins* 8 (11). <https://doi.org/10.3390/toxins8110307>.
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. « Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis ». *Nature Methods* 9 (7): 676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- 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.
- Schnauffer, Achim, G Desmond Clark-Walker, Alodie G Steinberg, et Ken Stuart. 2005. « The F1-ATP synthase complex in bloodstream stage trypanosomes has an unusual and essential function ». *The EMBO Journal* 24 (23): 4029-40. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600862>.
- Schott, Micah B., Shaun G. Weller, Ryan J. Schulze, Eugene W. Krueger, Kristina Drizyte-Miller, Carol A. Casey, et Mark A. McNiven. 2019. « Lipid droplet size directs lipolysis and lipophagy catabolism in hepatocytes ». *Journal of Cell Biology* 218 (10): 3320-35. <https://doi.org/10.1083/jcb.201803153>.
- Schuldiner, Maya, et Maria Bohnert. 2017. « A Different Kind of Love – Lipid Droplet Contact Sites ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (10): 1188-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2017.06.005>.
- Schwede, Angela, Olivia J. S. Macleod, Paula MacGregor, et Mark Carrington. 2015. « How Does the VSG Coat of Bloodstream Form African Trypanosomes Interact with External Proteins? ». *PLoS Pathogens* 11 (12): e1005259. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005259>.
- Servetnick, D. A., D. L. Brasaemle, J. Gruia-Gray, A. R. Kimmel, J. Wolff, et C. Londos. 1995. « Perilipins Are Associated with Cholesteryl Ester Droplets in Steroidogenic Adrenal Cortical and Leydig Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 270 (28): 16970-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.28.16970>.
- Shapiro, S. Z., J. Naessens, B. Liesegang, S. K. Moloo, et J. Magondu. 1984. « Analysis by Flow Cytometry of DNA Synthesis during the Life Cycle of African Trypanosomes ». *Acta Tropica* 41 (4): 313-23.
- Sheader, Karen, Sue Vaughan, James Minchin, Katie Hughes, Keith Gull, et Gloria Rudenko. 2005. « Variant surface glycoprotein RNA interference triggers a precytokinesis cell cycle arrest in African trypanosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (24): 8716-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501886102>.

- Silva Pereira, Sara, Daniela Brás, Teresa Porqueddu, Ana M. Nascimento, et Mariana De Niz. 2023. « Investigation of Trypanosoma-Induced Vascular Damage Sheds Insights into Trypanosoma Vivax Sequestration ». *Cell Surface (Amsterdam, Netherlands)* 10 (décembre):100113. <https://doi.org/10.1016/j.tcsw.2023.100113>.
- Silva Pereira, Sara, Mariana De Niz, Karine Serre, Marie Ouarné, Joana E. Coelho, Cláudio A. Franco, et Luisa M. Figueiredo. 2022. « Immunopathology and Trypanosoma Congolense Parasite Sequestration Cause Acute Cerebral Trypanosomiasis ». *eLife* 11 (juillet):e77440. <https://doi.org/10.7554/eLife.77440>.
- Silva Pereira, Sara, Sandra Trindade, Mariana De Niz, et Luisa M. Figueiredo. 2019. « Tissue tropism in parasitic diseases ». *Open Biology* 9 (5): 190036. <https://doi.org/10.1098/rsob.190036>.
- Silva Rodrigues, Jean Henrique da, Nathielle Miranda, Hélio Volpato, Tânia Ueda-Nakamura, et Celso Vataru Nakamura. 2019. « The Antidepressant Clomipramine Induces Programmed Cell Death in Leishmania Amazonensis through a Mitochondrial Pathway ». *Parasitology Research* 118 (3): 977-89. <https://doi.org/10.1007/s00436-018-06200-x>.
- Silvester, Eleanor, Julie Young, Alasdair Ivens, et Keith R. Matthews. 2017. « Interspecies Quorum Sensing in Co-Infections Can Manipulate Trypanosome Transmission Potential ». *Nature Microbiology* 2 (11): 1471-79. <https://doi.org/10.1038/s41564-017-0014-5>.
- Singh, Rajat, Susmita Kaushik, Yongjun Wang, Youqing Xiang, Inna Novak, Masaaki Komatsu, Keiji Tanaka, Ana Maria Cuervo, et Mark J. Czaja. 2009. « Autophagy Regulates Lipid Metabolism ». *Nature* 458 (7242): 1131-35. <https://doi.org/10.1038/nature07976>.
- Smirnova, Elena, Elysa B Goldberg, Kira S Makarova, Lin Lin, William J Brown, et Catherine L Jackson. 2006. « ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells ». *EMBO Reports* 7 (1): 106-13. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400559>.
- Smith, Terry K., Frédéric Bringaud, Derek P. Nolan, et Luisa M. Figueiredo. 2017. « Metabolic reprogramming during the Trypanosoma brucei life cycle ». *F1000Research* 6 (mai):F1000 Faculty Rev-683. <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>.
- Song, Jiunn, Arda Mizrak, Chia-Wei Lee, Marcelo Cicconet, Zon Weng Lai, Wei-Chun Tang, Chieh-Han Lu, Stephanie E. Mohr, Robert V. Farese, et Tobias C. Walther. 2022. « Identification of Two Pathways Mediating Protein Targeting from ER to Lipid Droplets ». *Nature Cell Biology* 24 (9): 1364-77. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-00974-0>.
- Stephens, Jennifer L., Soo Hee Lee, Kimberly S. Paul, et Paul T. Englund. 2007. « Mitochondrial Fatty Acid Synthesis in Trypanosoma Brucei ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (7): 4427-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M609037200>.

- Steверding, Dietmar. 2008. « The history of African trypanosomiasis ». *Parasites & Vectors* 1 (février):3. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-3>.
- . 2014. « The History of Chagas Disease ». *Parasites & Vectors* 7 (juillet):317. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-317>.
- . 2017. « The history of leishmaniasis ». *Parasites & Vectors* 10 (février):82. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2028-5>.
- Stuart, Ken, Reto Brun, Simon Croft, Alan Fairlamb, Ricardo E. Gürtler, Jim McKerrow, Steve Reed, et Rick Tarleton. 2008. « Kinetoplastids: Related Protozoan Pathogens, Different Diseases ». *The Journal of Clinical Investigation* 118 (4): 1301-10. <https://doi.org/10.1172/JCI33945>.
- Sui, Xuewu, Henning Arlt, Kelly P. Brock, Zon Weng Lai, Frank DiMaio, Debora S. Marks, Maofu Liao, Robert V. Farese Jr., et Tobias C. Walther. 2018. « Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin ». *Journal of Cell Biology* 217 (12): 4080-91. <https://doi.org/10.1083/jcb.201809067>.
- Sztalryd, Carole, et Dawn L. Brasaemle. 2017. « The Perilipin Family of Lipid Droplet Proteins: Gatekeepers of Intracellular Lipolysis ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862 (10 Pt B): 1221-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2017.07.009>.
- Szymanski, Kimberly M., Derk Binns, René Bartz, Nick V. Grishin, Wei-Ping Li, Anil K. Agarwal, Abhimanyu Garg, Richard G. W. Anderson, et Joel M. Goodman. 2007. « The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (52): 20890-95. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704154104>.
- Taleva, Gergana, Michaela Husová, Brian Panicucci, Carolina Hierro-Yap, Erika Pineda, Marc Biran, Martin Moos, et al. 2023. « Mitochondrion of the *Trypanosoma brucei* long slender bloodstream form is capable of ATP production by substrate-level phosphorylation ». *PLOS Pathogens* 19 (10): e1011699. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011699>.
- Tan, Yan-Jie, Yi Jin, Jun Zhou, et Yun-Fan Yang. 2023. « Lipid Droplets in Pathogen Infection and Host Immunity ». *Acta Pharmacologica Sinica*, novembre. <https://doi.org/10.1038/s41401-023-01189-1>.
- Tavares, Victor de Souza, Monara Viera de Castro, Rayane da Silva Oliveira Souza, Iana Kátia Araújo Gonçalves, Jonilson Berlink Lima, Valéria de Matos Borges, et Théo Araújo-Santos. 2022. « Lipid Droplets of Protozoan Parasites: Survival and Pathogenicity ». *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 116:e210270. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210270>.
- « The Petrie Papyri: Hieratic Papyri from Kahun and Gurob (Principally of the Middle Kingdom), by F. Ll. Griffith | The Online Books Page ». s. d. Consulté le 22 septembre 2023. <https://onlinebooks.library.upenn.edu/webbin/book/lookupid?key=olbp18346>.


- Tizard, I. R., et W. L. Holmes. 1976. « The Generation of Toxic Activity from *Trypanosoma Congolense* ». *Experientia* 32 (12): 1533-34. <https://doi.org/10.1007/BF01924436>.
- Tizard, I. R., W. L. Holmes, et K. Nielsen. 1978. « Mechanisms of the Anemia in Trypanosomiasis: Studies on the Role of the Hemolytic Fatty Acids Derived from *Trypanosoma Congolense* ». *Tropenmedizin Und Parasitologie* 29 (1): 108-14.
- 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.
- Toledo, Daniel A. M., Natália R. Roque, Livia Teixeira, Erix A. Milán-Garcés, Alan B. Carneiro, Mariana R. Almeida, Gustavo F. S. Andrade, et al. 2016. « Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism ». *PLoS ONE* 11 (8): e0160433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160433>.
- Toukara, Magamba, Alain Boulangé, Frédéric Bringaud, Magali Thonnus, Adrien Belem, Zakaria Bengaly, Sophie THÉVENON, David Berthier, et Loïc Rivière. 2021. « Les méthodes de diagnostic des trypanosomiasés animales africaines : avantages, limites et nouvelles pistes d'amélioration », janvier.
- Trindade, Sandra, Filipa Rijo-Ferreira, Tânia Carvalho, Daniel Pinto-Neves, Fabien Guegan, Francisco Aresta-Branco, Fabio Bento, et al. 2016. « *Trypanosoma brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice ». *Cell Host & Microbe* 19 (6): 837-48. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.002>.
- Tsai, Tsung-Huang, Elaine Chen, Lan Li, Pradip Saha, Hsiao-Ju Lee, Li-Shin Huang, Gregory S. Shelness, Lawrence Chan, et Benny Hung-Junn Chang. 2017. « The constitutive lipid droplet protein PLIN2 regulates autophagy in liver ». *Autophagy* 13 (7): 1130-44. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1319544>.
- Turner, M. J., M. L. Cardoso de Almeida, A. M. Gurnett, J. Raper, et J. Ward. 1985. « Biosynthesis, Attachment and Release of Variant Surface Glycoproteins of the African Trypanosome ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 117:23-55. https://doi.org/10.1007/978-3-642-70538-0_2.
- Upton, Julia E. M., Eyal Grunebaum, Gordon Sussman, et Peter Vadas. 2022. « Platelet Activating Factor (PAF): A Mediator of Inflammation ». *BioFactors (Oxford, England)* 48 (6): 1189-1202. <https://doi.org/10.1002/biof.1883>.
- Uttaro, Antonio D. 2014. « Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 196 (1): 61-70. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.04.001>.
- 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>.

- Valli, V. E., et C. M. Forsberg. 1979. « The Pathogenesis of Trypanosoma Congolense Infection in Calves. V. Quantitative Histological Changes ». *Veterinary Pathology* 16 (3): 334-68. <https://doi.org/10.1177/030098587901600307>.
- Van Den Abbeele, J., Y. Claes, D. van Bockstaele, D. Le Ray, et M. Coosemans. 1999. « Trypanosoma Brucei Spp. Development in the Tsetse Fly: Characterization of the Post-Mesocyclic Stages in the Foregut and Proboscis ». *Parasitology* 118 (Pt 5) (mai):469-78. <https://doi.org/10.1017/s0031182099004217>.
- Van Hellemond, J. J., F. R. Opperdoes, et A. G. Tielens. 1998. « Trypanosomatidae Produce Acetate via a Mitochondrial Acetate:Succinate CoA Transferase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (6): 3036-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3036>.
- Vanhollebeke, Benoit, Géraldine De Muylder, Marianne J. Nielsen, Annette Pays, Patricia Tebabi, Marc Dieu, Martine Raes, Soren K. Moestrup, et Etienne Pays. 2008. « A Haptoglobin-Hemoglobin Receptor Conveys Innate Immunity to Trypanosoma Brucei in Humans ». *Science (New York, N.Y.)* 320 (5876): 677-81. <https://doi.org/10.1126/science.1156296>.
- Vassella, Erik, Jan Van Den Abbeele, Peter Bütikofer, Christina Kunz Renggli, André Furger, Reto Brun, et Isabel Roditi. 2000. « A major surface glycoprotein of Trypanosoma brucei is expressed transiently during development and can be regulated post-transcriptionally by glycerol or hypoxia ». *Genes & Development* 14 (5): 615-26.
- Vassella, Erik, Michael Oberle, Simon Urwyler, Christina Kunz Renggli, Erwin Studer, Andrew Hemphill, Cristina Fragoso, Peter Bütikofer, Reto Brun, et Isabel Roditi. 2009. « Major Surface Glycoproteins of Insect Forms of Trypanosoma Brucei Are Not Essential for Cyclical Transmission by Tsetse ». *PLOS ONE* 4 (2): e4493. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004493>.
- Viegas, Idálio J., et Luisa M. Figueiredo. 2022. « From Trans-Splicing Discovery and Onwards, Trypanosomes Lead the Way ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 23 (6): 388-388. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00489-4>.
- Vielemeyer, Ole, Michael T. McIntosh, Keith A. Joiner, et Isabelle Coppens. 2004. « Neutral Lipid Synthesis and Storage in the Intraerythrocytic Stages of Plasmodium Falciparum ». *Molecular and Biochemical Parasitology* 135 (2): 197-209. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.08.017>.
- 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>.
- Walther, Tobias C., Jeeyun Chung, et Robert V. Farese. 2017. « Lipid Droplet Biogenesis ». *Annual review of cell and developmental biology* 33 (octobre):491-510. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060608>.
- Wamwiri, Florence Njeri, et Robert Emojong Changasi. 2016. « Tsetse Flies (Glossina) as Vectors of Human African Trypanosomiasis: A Review ». *BioMed Research International* 2016:6201350. <https://doi.org/10.1155/2016/6201350>.

- Wang, et Edward A Dennis. 1999. « Mammalian lysophospholipases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1439 (1): 1-16. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(99\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(99)00063-3).
- Wang, Hong, Ming Bell, Urmilla Sreenevasan, Hong Hu, Jun Liu, Knut Dalen, Constantine Londos, et al. 2011. « Unique Regulation of Adipose Triglyceride Lipase (ATGL) by Perilipin 5, a Lipid Droplet-associated Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (18): 15707-15. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.207779>.
- Wang, Hong, Liping Hu, Knut Dalen, Heidi Dorward, Amy Marcinkiewicz, Deanna Russell, Dawei Gong, et al. 2009. « Activation of Hormone-sensitive Lipase Requires Two Steps, Protein Phosphorylation and Binding to the PAT-1 Domain of Lipid Droplet Coat Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (46): 32116-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.006726>.
- Wang, Hong, Urmilla Sreenivasan, Hong Hu, Andrew Saladino, Brian M. Polster, Linda M. Lund, Da-Wei Gong, William C. Stanley, et Carole Sztalryd. 2011. « Perilipin 5, a Lipid Droplet-Associated Protein, Provides Physical and Metabolic Linkage to Mitochondria ». *Journal of Lipid Research* 52 (12): 2159-68. <https://doi.org/10.1194/jlr.M017939>.
- Wang, R. Loo, Z. Chen, et E. A. Dennis. 1997. « Regiospecificity and Catalytic Triad of Lysophospholipase I ». *The Journal of Biological Chemistry* 272 (35): 22030-36. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22030>.
- Wagnies, Marion, Eloïse Bertiaux, Edern Cahoreau, Nicole Ziebart, Aline Crouzols, Pauline Morand, Marc Biran, et al. 2018. « Gluconeogenesis Is Essential for Trypanosome Development in the Tsetse Fly Vector ». *PLoS Pathogens* 14 (12): e1007502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007502>.
- 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>.
- Wheeler, Richard J., Keith Gull, et Jack D. Sunter. 2019. « Coordination of the Cell Cycle in Trypanosomes ». *Annual Review of Microbiology* 73 (septembre):133-54. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115617>.
- Wilfling, Florian, Huajin Wang, Joel T. Haas, Natalie Krahmer, Travis J. Gould, Aki Uchida, Ji-Xin Cheng, et al. 2013. « Triacylglycerol Synthesis Enzymes Mediate Lipid Droplet Growth by Relocalizing from the ER to Lipid Droplets ». *Developmental cell* 24 (4): 384-99. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.01.013>.
- 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).
- Wolins, Nathan E., Benjamin K. Quaynor, James R. Skinner, Anatoly Tzekov, Michelle A. Croce, Matthew C. Gropler, Vijayalakshmi Varma, et al. 2006. « OXPAT/PAT-1 Is a PPAR-Induced Lipid Droplet Protein That Promotes Fatty Acid Utilization ». *Diabetes* 55 (12): 3418-28. <https://doi.org/10.2337/db06-0399>.

- Wolins, Nathan E., James R. Skinner, Marissa J. Schoenfish, Anatoly Tzekov, Kenneth G. Bensch, et Perry E. Bickel. 2003. « Adipocyte Protein S3-12 Coats Nascent Lipid Droplets ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37713-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304025200>.
- Xong, H. V., L. Vanhamme, M. Chamekh, C. E. Chimfwembe, J. Van Den Abbeele, A. Pays, N. Van Meirvenne, R. Hamers, P. De Baetselier, et E. 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).
- Yan, Renhong, Hongwu Qian, Ivan Lukmantara, Mingming Gao, Ximing Du, Nieng Yan, et Hongyuan Yang. 2018. « Human SEIPIN Binds Anionic Phospholipids ». *Developmental Cell* 47 (2): 248-256.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.010>.
- Yang, H., M. Bard, D. A. Bruner, A. Gleeson, R. J. Deckelbaum, G. Aljinovic, T. M. Pohl, R. Rothstein, et S. L. Sturley. 1996. « Sterol Esterification in Yeast: A Two-Gene Process ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5266): 1353-56. <https://doi.org/10.1126/science.272.5266.1353>.
- Yue, Lambert, Michael J. McPhee, Kevin Gonzalez, Mark Charman, Jonghwa Lee, Jordan Thompson, Dirk F. H. Winkler, Rosemary B. Cornell, Steven Pelech, et Neale D. Ridgway. 2020. « Differential dephosphorylation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase upon translocation to nuclear membranes and lipid droplets ». *Molecular Biology of the Cell* 31 (10): 1047-59. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-01-0014>.
- Zambelli, Vanessa O., Gisele Picolo, Carlos A. H. Fernandes, Marcos R. M. Fontes, et Yara Cury. 2017. « Secreted Phospholipases A2 from Animal Venoms in Pain and Analgesia ». *Toxins* 9 (12): 406. <https://doi.org/10.3390/toxins9120406>.
- Zechner, Rudolf, Frank Madeo, et Dagmar Kratky. 2017. « Cytosolic Lipolysis and Lipophagy: Two Sides of the Same Coin ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 18 (11): 671-84. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.76>.
- Zhang, Sheng, Xueqiang Peng, Shuo Yang, Xinyu Li, Mingyao Huang, Shibo Wei, Jiaying Liu, et al. 2022. « The Regulation, Function, and Role of Lipophagy, a Form of Selective Autophagy, in Metabolic Disorders ». *Cell Death & Disease* 13 (2): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04593-3>.
- Zhang, Zhongyang, Zhenghang Yu, Dianyuan Liang, Ke Song, Xiangxin Kong, Ming He, Xinxin Liao, et al. 2024. « Roles of Lipid Droplets and Related Proteins in Metabolic Diseases ». *Lipids in Health and Disease* 23 (1): 218. <https://doi.org/10.1186/s12944-024-02212-y>.
- Zíková, Alena. 2022. « Mitochondrial Adaptations throughout the Trypanosoma Brucei Life Cycle ». *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 69 (6): e12911. <https://doi.org/10.1111/jeu.12911>.

Streptococcus pyogenes Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in *Trypanosoma* and *Leishmania*

Corinne Asencio¹ | Perrine Hervé¹ | Pauline Morand¹ | Quentin Oliveres¹ |
Chloé Alexandra Morel¹ | Valérie Prouzet-Mauleon² | Marc Biran³ | Sarah Monic¹ |
Mélanie Bonhivers¹ | Derrick Roy Robinson¹ | Marc Ouellette⁴ | Loïc Rivière¹ |
Frédéric Bringaud¹ | Emmanuel Tetaud¹ 

¹Univ. Bordeaux, CNRS, MFP, UMR 5234, Bordeaux, France

²Univ. Bordeaux, CNRS/INSERM, TBMCORE/CRISP²edit, UAR 3427/US005, Bordeaux, France

³Univ. Bordeaux, CNRS, CRMSB, UMR 5536, Bordeaux, France

⁴Centre de Recherche en Infectiologie du Centre de Recherche du CHU de Québec, Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, Québec, Canada

Correspondence

Emmanuel Tetaud, CNRS, MFP, UMR 5234, Univ. Bordeaux, Bordeaux F-33000, France.
Email: emmanuel.tetaud@u-bordeaux.fr

Funding information

Fondation pour la Recherche Médicale, Grant/Award Number: EQU201903007845; IDEX; Canadian Institutes of Health Research; Centre National de la Recherche Scientifique; Université de Bordeaux; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: ANR-11-LABX-0024, ANR-20-CE91-0003, ANR19-CE15-0004-01 and ANR-19-CE17-0014-03

Abstract

Kinetoplastids are unicellular eukaryotic flagellated parasites found in a wide range of hosts within the animal and plant kingdoms. They are known to be responsible in humans for African sleeping sickness (*Trypanosoma brucei*), Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*), and various forms of leishmaniasis (*Leishmania* spp.), as well as several animal diseases with important economic impact (African trypanosomes, including *Trypanosoma congolense*). Understanding the biology of these parasites necessarily implies the ability to manipulate their genomes. In this study, we demonstrate that transfection of a ribonucleoprotein complex, composed of recombinant *Streptococcus pyogenes* Cas9 (*SpCas9*) and an in vitro-synthesized guide RNA, results in rapid and efficient genetic modifications of trypanosomatids, in marker-free conditions. This approach was successfully developed to inactivate, delete, and mutate candidate genes in various stages of the life cycle of *T. brucei* and *T. congolense*, and *Leishmania* promastigotes. The functionality of *SpCas9* in these parasites now provides, to the research community working on these parasites, a rapid and efficient method of genome editing, without requiring plasmid construction and selection by antibiotics but requires only cloning and PCR screening of the clones. Importantly, this approach is adaptable to any wild-type parasite.

KEYWORDS

CRISPR/Cas9, efficiency, kinetoplastids, marker-free, protist, ribonucleoprotein complex transfection, universal

Corinne Asencio and Perrine Hervé co-first authors.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2024 The Authors. *Molecular Microbiology* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

In the realm of modern molecular biology, few innovations have captured the world's attention like CRISPR-Cas9. The CRISPR-Cas9 system has catapulted molecular biology into a new era of precision gene editing and genetic engineering. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) and CRISPR-associated protein 9 (CRISPR-Cas9) is a revolutionary genome-editing technology that has unlocked unprecedented opportunities for precise manipulation of the genetic code. Since its discovery in the early 2000s (Barrangou et al., 2007; Mojica et al., 2005), CRISPR-Cas9 has rapidly evolved into a game-changing tool with the potential to transform medicine, agriculture, biotechnology, and various other fields (Jinek et al., 2012). This groundbreaking system is derived from a remarkable natural defense mechanism found in bacteria and archaea, allowing researchers to edit, correct, or modify genes with accuracy and efficiency that was previously unimaginable (Barrangou et al., 2007; Ishino et al., 1987; Mojica et al., 2005).

This technology was very quickly used to study trypanosomatids, which are unicellular eukaryotic flagellate parasites that affect millions of people and animals worldwide (Peng et al., 2014). In humans, they are responsible for African sleeping sickness (Human African trypanosomiasis), Chagas disease (American trypanosomiasis), and leishmaniasis in South America, Africa, India, the Mediterranean region, and the Middle East. Animal African Trypanosomiasis, including Nagana, are debilitating disease affecting livestock, primarily cattle in sub-Saharan Africa. Nagana, which is caused by *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax*, and *Trypanosoma brucei brucei*, leads to severe health issues, including anemia, weight loss, and decreased productivity in infected animals, making it a significant economic and agricultural concern in affected regions (Desquesnes et al., 2022). Understanding the biology of these parasites necessarily requires the ability to manipulate their genomes. Before the development of the CRISPR-Cas9 system, genome modification was achieved through homologous recombination using resistance markers for selection, or by RNA interference, but only in *T. brucei* (Ngo et al., 1998) and *T. congolense* (Coustou et al., 2012; Inoue et al., 2002) as *T. cruzi* and some *Leishmania* do not share the RNA interference machinery (Kolev et al., 2011). It is noteworthy, however, that *Leishmania* subgenus *Vianna* still has functional RNA interference machinery (Lye et al., 2022). Because of genome diploidy, deletion/inactivation of genes proved to be time-consuming and conditioned by the limited number of available antibiotic resistance markers. This is even more true in *Leishmania* spp., where a high frequency of aneuploidy is frequently observed (Imamura et al., 2016; Mannaert et al., 2012; Rogers et al., 2011).

The CRISPR-Cas9 system has been now employed to modify the genomes of *T. brucei*, *T. cruzi*, and *Leishmania* spp. with a rapidly growing number of publications (founding articles are: Beneke et al., 2017; Kovarova et al., 2022; Lander et al., 2015, 2016, 2017; Peng et al., 2014; Rico et al., 2018; Shaw et al., 2020; Sollelis

et al., 2015; Zhang et al., 2017; Zhang & Matlashewski, 2015). In most studies, Cas9 or Cas9-gRNA complexes are endogenously expressed after transfection of the parasites and selection with antibiotic resistance markers. However, constitutive expression of Cas9 has shown, in rare cases, genomic instability (Boutin et al., 2021; Zhang et al., 2017) and could lead to a decrease in cell growth (Peng et al., 2014; Ryan et al., 2014). Conditional expression of Cas9, as described in *T. brucei*, is helpful in overcoming this issue (Kovarova et al., 2022; Rico et al., 2018). Another issue with the CRISPR-Cas9 system is the potential off-target genome disruption (Fu et al., 2013). The transient expression of guide RNAs, combined with the constitutive expression of Cas9 and a repair DNA construct, represents a possibility to limit off-target effects and reduce other potential undesirable effects associated with Cas9 targeting. The ongoing development of new, increasingly accurate Cas9 variants, should also limit this problem. Interestingly, CRISPR-mediated editing can be achieved by transfecting cells with *in vitro*-generated Cas9 protein/guide RNA complexes. As recombinant Cas9 is rapidly eliminated after transfection, this approach, which limits potential off-targets (D'Astolfo et al., 2015) and reduces toxicity issues (Kim et al., 2014; Liang et al., 2015), has proven to be particularly efficient in *T. cruzi* and *Plasmodium* sp. (Crawford et al., 2017; Soares Medeiros et al., 2017). This method is straightforward, fast, and highly efficient, as it does not require gene cloning and minimizes the use of selection markers. However, genome modification with *in vitro*-generated Cas9 protein/guide RNA complexes in *T. cruzi*, *Leishmania* spp., and *T. brucei* relies, in the study by Soares Medeiros et al. (2017), exclusively on the use of a smaller Cas9, isolated from *Staphylococcus aureus* (SaCas9) (Soares Medeiros et al., 2017). The same authors also reported that Cas9 isolated from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9), despite being the most commonly used and commercialized, does not function in these parasites, and the lack of activity appears to be due to the larger size of SpCas9 compared to SaCas9, which is approximately 40kDa smaller (Soares Medeiros et al., 2017).

In this study, we have demonstrated that SpCas9 is fully functional after transfection of the Cas9/gRNA complex in both the bloodstream (BSF) and procyclic (PCF) forms of *T. brucei* and *T. congolense*, as well as in the promastigotes of *Leishmania infantum*. This Cas9/gRNA complex can be delivered into cells, with or without a repair sequence, to inactivate, mutate, or tag candidate genes, without the need for selection markers and with very high efficiency. The functionality of SpCas9 in these parasites now provides the research community working on these parasites a rapid and efficient method for genome edition without requiring gene cloning and/or selection, that only requires cloning of modified cell lines. The key point of this approach is the generation of homozygous clones with high efficiency in a single round of transfection. It will also allow genome editing of cells that are difficult to cultivate or whose cell density is too low to envisage using conventional techniques, such as field isolates. Finally, this approach should be adaptable to all kinetoplastids and, importantly, any transfectable cell type.

2 | RESULTS

2.1 | The SpCas9/RNP complex is functional for genome editing activity

Soares Medeiros et al. described in *T. cruzi*, *T. brucei* and *Leishmania* the unexpected result that exogenous ribonucleoprotein Cas9 from *Streptococcus pyogenes* (SpCas9, 163 kDa) was not functional after transfection, in contrast to the smaller *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9, 124 kDa) (Soares Medeiros et al., 2017). Since SpCas9 is fully active when endogenously expressed (Lander et al., 2015; Peng et al., 2014; Sollelis et al., 2015; Zhang & Matlashewski, 2015), it was proposed that ribonucleoprotein SpCas9 complexes are not internalized by electroporation in trypanosomatids. To revisit these data, we tried to inactivate a constitutively expressed cytosolic GFP in *T. brucei* PCF using extracellular RNP complexes composed of SpCas9 and guide RNAs (gRNAs). The guide RNAs consist of an optimized and chemically modified Alt-R CRISPR-Cas9 crRNA specifically designed to target the gene of interest, complexed with a tracrRNA, a conserved 67-nt RNA sequence essential for forming the guide RNA recognized by *S. pyogenes* Cas9. All guide RNAs are from Integrated DNA Technologies (IDT). We used the commercial SpCas9 from IDT (Alt-R™ SpCas9 Nuclease 3NLS) and three gRNAs targeting different sequences of the GFP gene (Table S1). GFP expression was monitored by flow cytometry at 24, 48, and 72 h post-transfection with the RNP complexes (Figure 1a). 5×10^5 GFP-expressing *T. brucei* PCF cells were subjected to electroporation with 20 μ g of gRNA-loaded SpCas9 (GFP1, 2, or 3), or gRNA only as a control (GFP2). Unexpectedly, transfection of GFP-expressing PCF without SpCas9 (Figure 1a—Top left panel) resulted in a very strong drop in fluorescence after 24 h for about 50% of the population, probably related to the electroporation conditions. However, 48 h later, GFP expression recovered to its initial level (Figure 1a—Top left panel). Importantly, a strong decrease in fluorescence occurred immediately after transfection with GFP1, GFP2, and GFP3 gRNA-loaded SpCas9, which did not recover to its initial level after 72 h (Figure 1a—gRNA GFP1, GFP2, and GFP3), indicating that a significant portion of cells did not express active GFP anymore. It is noteworthy that GFP1 and GFP2 gRNA are more efficient at inactivating GFP expression than GFP3 gRNA (Figure 1a—Bar chart) and the efficiency depends on the amount of RNP complex transfected (1.5-fold increase in GFP-negative cells with a 3-fold increase in GFP2 gRNA-loaded SpCas9) (Figure 1a—Bar chart).

To confirm that the decrease in GFP expression is indeed caused by Cas9/gRNA-dependent GFP gene inactivation, we cell-sorted and cloned cells failing to express GFP and sequenced the DNA region targeted by the GFP2 guide RNA used (Figure 1c). As expected, a 33-bp deletion at the gRNA targeting site was observed in all GFP-negative cells (Figure 1c). The deleted region is flanked by two 8-bp homologous sequences, which suggests a repair of double-strand breaks by the microhomology-mediated end-joining (MMEJ) pathway as previously described in *T. cruzi* and

Leishmania (Peng et al., 2014; Zhang et al., 2017). These data show that the commercial SpCas9 from IDT is fully functional in our experimental protocols and suggest that the size of the exogenous ribonucleoprotein complex is not a limiting factor, contrary to the hypothesis made for *T. cruzi*. The only difference that we could identify between the IDT SpCas9 and the one used by Soares Medeiros et al. (2017) is the number of nuclear localization signals (NLS), three versus two, suggesting that the lack of activity in *T. cruzi* could be explained by weak nuclear targeting of the complex after transfection.

In order to produce our own in-house recombinant Cas9 protein, we constructed a recombinant DNA SpCas9 sequence (eSpCas9, a rationally engineered Cas9 with improved specificity (Slaymaker et al., 2016)) containing three NLS regions, that is, one at the N-terminus and two at the C-terminus of the protein, plus two polyhistidine tracts to allow the purification of the expressed recombinant protein by chromatography (Figure 1b). The protein was expressed and purified in *E. coli* (Cf. Experimental procedures, Figure S1) and its activity was assayed by replacing the IDT SpCas9 with the eSpCas9 in the GFP2 gRNA/Cas9 complex. As expected, the purified eSpCas9 is able to dose-dependently inactivate GFP expression (Figure 1b). Note that above 40 μ g of eSpCas9, there is no further decrease in GFP expression (Figure 1b, right). Sequencing of the GFP gene in cloned cell lines confirmed the inactivation of the gene by a 33-bp deletion. A larger 97-bp deletion flanked by two 6-bp homologous regions was also detected in clone Bc3 (Figure 1c). It is worth noting that the presence of polyhistidine tracts, one each at the N and C-terminal of the protein, does not appear to affect Cas9 activity. We concluded that the edition of PCF *T. brucei* genes with SpCas9/gRNA complexes is functional and the use of laboratory-produced eSpCas9 is equally effective as the commercial SpCas9 (IDT).

2.2 | Development of a marker-free approach for editing the genomes of *T. brucei* PCF and BSF

Cas9-mediated double-strand DNA breaks can be repaired by homology-directed repair (HDR), as long as an appropriate repair template is provided (Peng et al., 2014). We have tested this by inactivating the *TbFis1* gene (Tb927.10.8660), in both *T. brucei* PCF and BSF using marker-dependent and marker-free approaches. *TbFis1* protein is a potential homolog of the mitochondrial fission factor identified in yeast, Fis1p (Mozdy et al., 2000), which enables the recruitment of the dynamin Dnm1 to the mitochondria and triggers mitochondrial fission. The first approach consists of inserting a repair template encoding a resistance gene (in this case against phleomycin, *BleR*) flanked by 5' and 3' regulatory sequences and a short homology region of the *TbFis1* gene flanking the Cas9-cleavage site (50 bp) (Figure 2a). Cells were cloned after 8 to 12 days of culture in the presence of phleomycin. The correct insertion of the repair DNA fragment was controlled by PCR and sequencing, as shown in Figure 2b,c. After Cas9-mediated

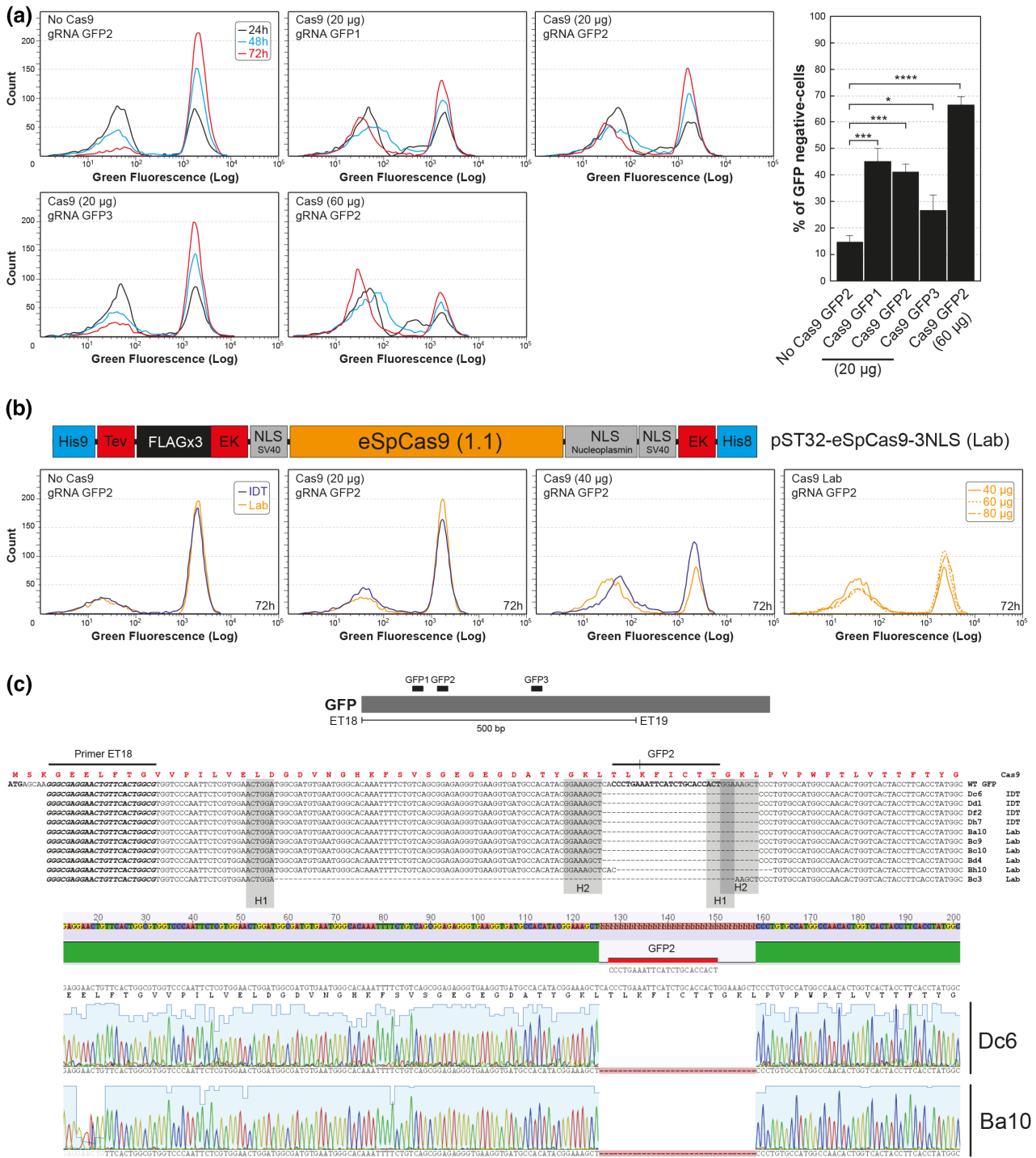


FIGURE 1 GFP inactivation in *T. brucei* PCF. (a) Fluorescence flow cytometry analysis of *T. brucei* constitutively expressing a cytosolic eGFP. GFP fluorescence was monitored over time from 24 to 72 h after transfection with 20 μ g (no Cas9, Cas9/gRNA GFP1, Cas9/gRNA GFP2, Cas9/gRNA GFP3) or 60 μ g (Cas9/gRNA GFP2) of RNP complexes from IDT, and a bar chart showing the percentage of GFP-negative cells at 72 h after transfection with the different guides ($n = 3$). Prism software was employed for statistical analysis, utilizing *t*-tests (unpaired, normal distribution, parametric test, and two-tailed). The significance levels (*p* values) are represented by asterisks. (b) The top panel shows a schematic representation of the plasmid allowing eSpCas9 expression in *E. coli*. The blue boxes represent the two polyhistidine sequences at the N and C-termini of the protein, the red boxes represent the cleavage sites of TEV and enterokinase (EK) proteases, the gray boxes represent the three nuclear localization signals (NLS), the black box represents three repeats of the FLAG epitope and the orange box represents the eSpCas9 coding sequence. The bottom panel shows the fluorescence flow cytometry analysis of *T. brucei* expressing the GFP monitored at 72 h after transfection with RNPs complexes from IDT or laboratory-purified (Lab) (no Cas9, 20 μ g Cas9/gRNA GFP2, 40 μ g Cas9/gRNA GFP2, 40, 60, and 80 μ g Cas9/gRNA GFP2). (c) Sequence comparison of a portion of the GFP gene from clones no longer expressing GFP. The sequence shows only the region targeted by the GFP2 guide RNA. The gray boxes (H1 and H2) highlight the homology regions probably used for repair by MMEJ. Sequences resulting from inactivation by laboratory-purified Cas9 and those from commercial Cas9 are labeled Lab and IDT, respectively. Below is shown the corresponding chromatogram of the Dc6 and Ba10 clones (Confidence interval 95%—*p*-value style: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (***); <0.0001 (****)).

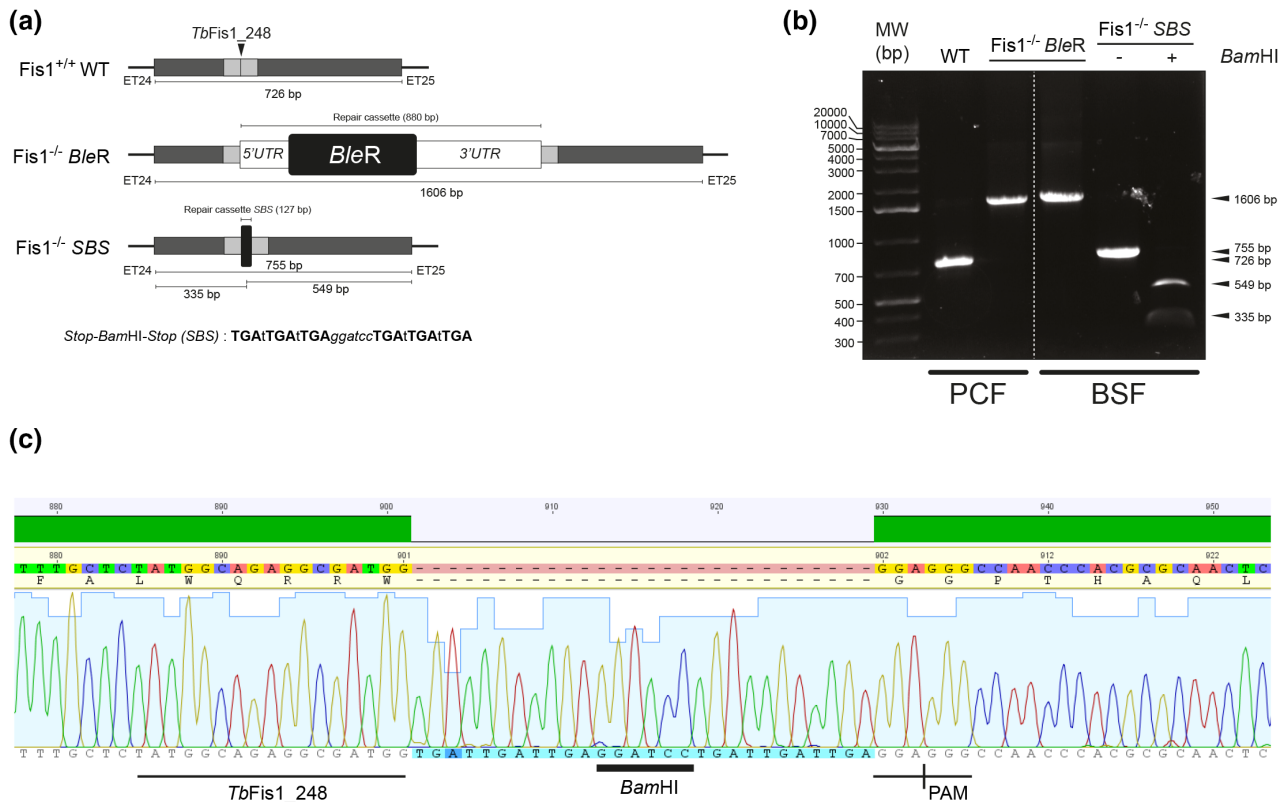


FIGURE 2 Inactivation of the *TbFis1* gene in both *T. brucei* PCF and BSF. (a) Schematic representation of the *TbFis1* locus and the two inactivation strategies by inserting the phleomycin resistance marker (*BleR*) or a short sequence containing a succession of stop codons (SBS). The position of the guide RNA is indicated by a vertical arrow (*TbFis1_248*) and the 50-bp flanking sequences allowing repair through HDR are shown in gray. The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are depicted as white boxes. (b) PCR confirmation of *TbFis1* gene inactivation on both alleles in PCF and BSF cells (the gel shows the PCR results of a single PCF and a single BSF clone among the various clones tested). PCR products (primer ET24/ET25) are directly analyzed on agarose gel (*Fis1*^{-/-} *BleR*) or after its digestion with *Bam*HI (*Fis1*^{-/-} SBS), allowing easy discrimination of gene inactivation on both alleles. (c) Chromatogram of the *TbFis1* sequence highlighting the insertion of the SBS cassette.

recombination, the size of the targeted *TbFis1* gene increased by 880bp, which corresponds to the size of the repair cassette (Figure 2b). Both alleles encoding *TbFis1* (homozygotes) were targeted in 100% of PCF clones but in only 10% of BSF clones (Figure 2b). The 90% remaining BSF clones had a single allele inactivated (heterozygotes) (Table 1).

The second approach consists of inserting a shorter repair cassette composed of stop codons in all three reading frames and a restriction site absent in the targeted gene (here *Bam*HI), flanked by short regions of homology corresponding to 50-bp flanking the Cas9-cleavage site (Figure 2a–SBS). The *Bam*HI restriction site enables rapid discrimination of repair template integration on one or two alleles after PCR and digestion with *Bam*HI. Under these marker-free conditions, cells were cloned 1 to 3 days after transfection and insertion of the repair cassette was tested by PCR/*Bam*HI digestion and sequencing (Figure 2b–SBS). 3% and 4% of the BSF clones tested were inactivated on both alleles or one allele only, respectively (Table 1). Obtaining a large number of homozygous mutants confirms that the *TbFis1* gene is not essential for PCF and BSF growth. Incidentally, the inactivation of the *TbFis1* gene did not induce a change in mitochondrial structure (Figure S2A,B).

2.3 | Inactivation of a *T. brucei* multigene family by *SpCas9*

Genetic manipulation of trypanosomatids is often difficult when a high number of resistance markers are required, as exemplified by the sequential inactivation of several genes or when multigene families are addressed (Reis-Cunha et al., 2018). We, therefore, tested whether transfection, with the gRNA/RNP complex, is also effective for the inactivation of a multigene family, here the one encoding glycerol kinase (GK) in *T. brucei* PCF. RNAi-mediated down-regulation of GK expression has shown that, in standard growth conditions, this non-essential gene family is required to metabolize glycerol in *T. brucei* PCF and BSF (Allmann et al., 2021; Pineda et al., 2018). GK is encoded by 11 tandemly arranged copies distributed over the two alleles, containing five and six copies, respectively (Figures 3a and S3A,B). We tested a single gRNA targeting the entire multigenic family and a repair cassette including the phleomycin resistance marker (*BleR*) (Figure 3a). The fate of the allelic GK gene clusters after transfection and selection with phleomycin was tested by PCR using primers flanking the Cas9 recognition site. All the tested phleomycin-resistant clones (11 clones) showed the presence of a single ~1500-bp band corresponding to the parental allele (616bp) inactivated by insertion of the repair cassette (880bp),

TABLE 1 Summary of the various CRISPR/Cas9 inactivation experiments.

Gene targeted	Parasite	Inactivation cassette	Numbers of tested clones	Homozygous	Heterozygous	Both alleles inactivated (%)
Fis1	<i>T. brucei</i> PCF	<i>BleR</i> +3'/5'UTR	5	5	0	100
	<i>T. brucei</i> BSF		12	1	11	8
	<i>T. brucei</i> BSF	<i>PacR</i> without UTR	34	0	33	0
	<i>T. brucei</i> BSF	SBS	76	2	3	3
GK	<i>T. brucei</i> PCF	<i>BleR</i> +3'/5'UTR	11	11	0	100
ALDH	<i>L. infantum</i> Pro	<i>PacR</i> without UTR	39	12	1	31
	<i>L. infantum</i> Pro	<i>mRED</i> without UTR	6	5	1	83
	<i>L. infantum</i> Pro	SBS	12	4	0	33
LysoPLA	<i>T. congolense</i> BSF	<i>BleR</i> +3'/5'UTR	4	4	0	100
	<i>T. congolense</i> PCF	SBS	5	3	0	60
GK	<i>T. congolense</i> BSF	<i>BleR</i> +3'/5'UTR	4	3	1	75
Gene targeted	Parasite	Inactivation cassette	GFP negative cells tested	WT GFP	Mutated GFP	Inactivated cells (%)
GFP ^a	<i>T. brucei</i> PCF	None	16	3	13	81

Abbreviation: SBS, a short sequence containing a succession of stop codons.

^aThe GFP gene was integrated into a single allele in the genome, and the selection of clones was based on the absence of fluorescence.

suggesting that GK genes are inactivated (Figure 3b, Table 1). This was confirmed by a Southern-blot analysis with the GK probe after digestion of the genomic DNA with a restriction enzyme present once in each of the GK repeat units (*KpnI*), which generated a 5197-bp band corresponding to the GK copy located at the 5' end of both allelic clusters (two copies) plus an intense 3582-bp band corresponding to the other GK genes (nine copies) (Figure 3a,c). As expected, the genome of all the tested mutant cell lines contains two *KpnI* bands-containing GK whose size is increased by ~800bp, corresponding to the length of the repair cassette. It is noteworthy that, following cleavage by Cas9 in the same locus, it is likely that several GK copies were deleted by homologous recombination. Indeed, a Southern blot analysis of genomic DNA digested by *MfeI* (which is absent in the GK repeat units), revealed a significant reduction of the size of one GK allelic cluster in the 1B10, 2G2, and 2F11 clones (Figure S3). As expected, a western blot analysis with the anti-GK immune serum showed that GK expression is abolished in all the analyzed mutant cell lines, confirming that they are bona fide GK null mutants (GK^{-/-}) (Figure 3d). In addition, glycerol metabolism is abolished in the GK^{-/-} cell lines, as shown by quantitative

proton NMR spectrometry analyses of the ¹³C-enriched end products excreted from the metabolism of uniformly ¹³C-enriched glycerol ([U-¹³C]-glycerol) (Allmann et al., 2021; Bringaud et al., 2015; Pineda et al., 2018). Indeed, the parental PCF *T. brucei* convert [U-¹³C]-glucose or [U-¹³C]-glycerol to ¹³C-enriched acetate and succinate. In contrast, the excretion of ¹³C-enriched end products from [U-¹³C]-glycerol is abolished in the GK^{-/-} 2E6 cell line, while the metabolism of [U-¹³C]-glucose is unaffected (Figure 3e). Taken together, these data demonstrate the high efficiency of a single transfection with gRNA/*SpCas9* complexes to inactivate all copies of a large multigene family.

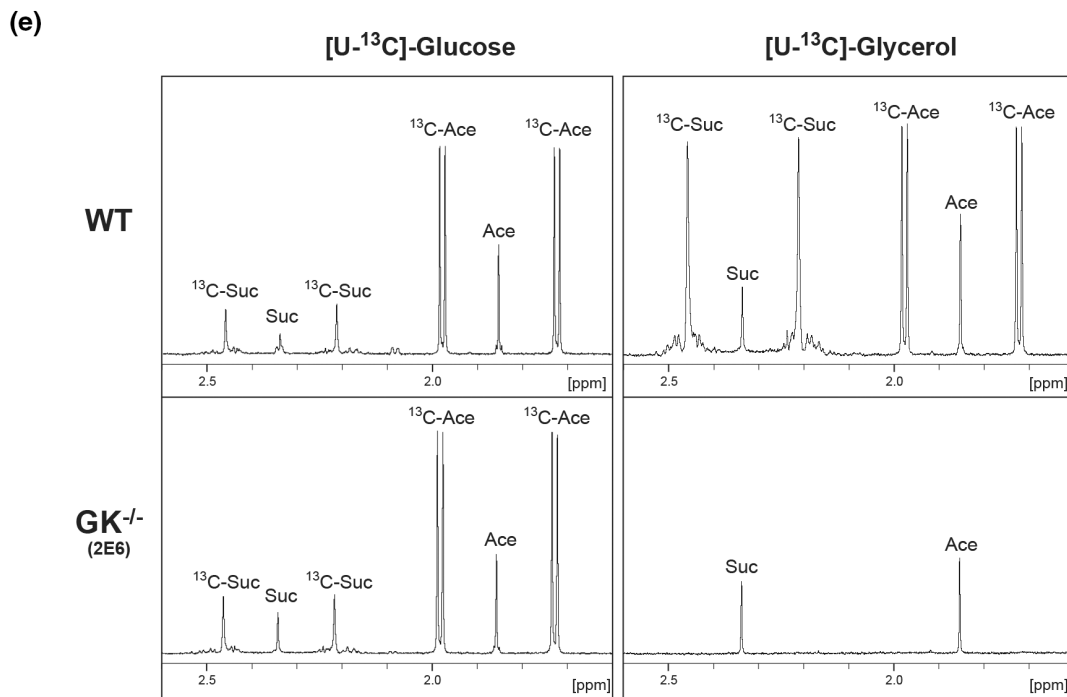
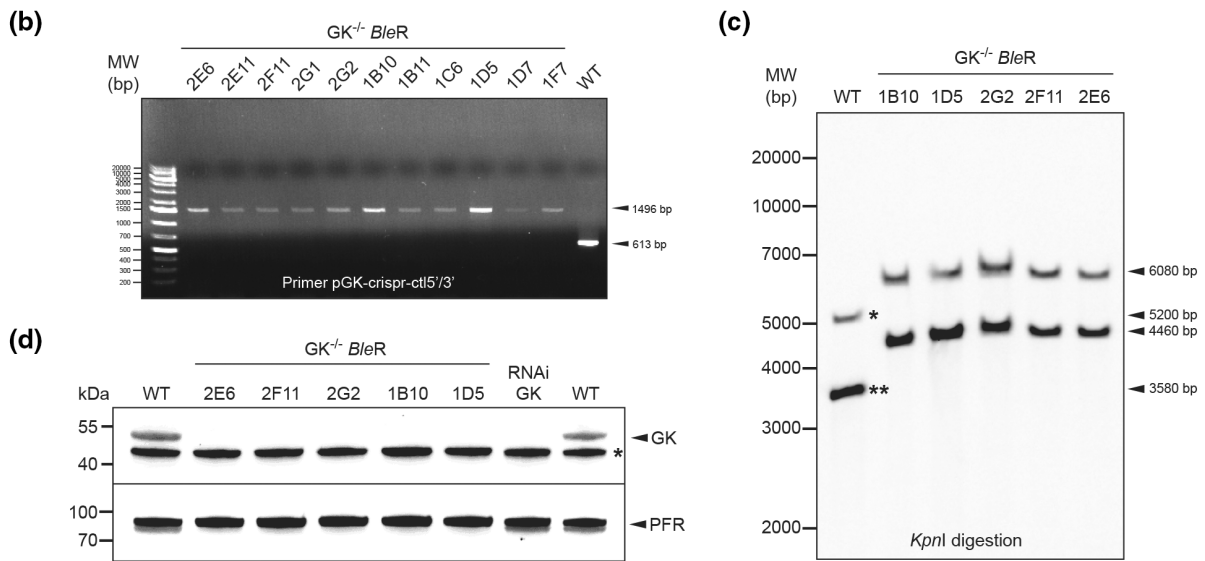
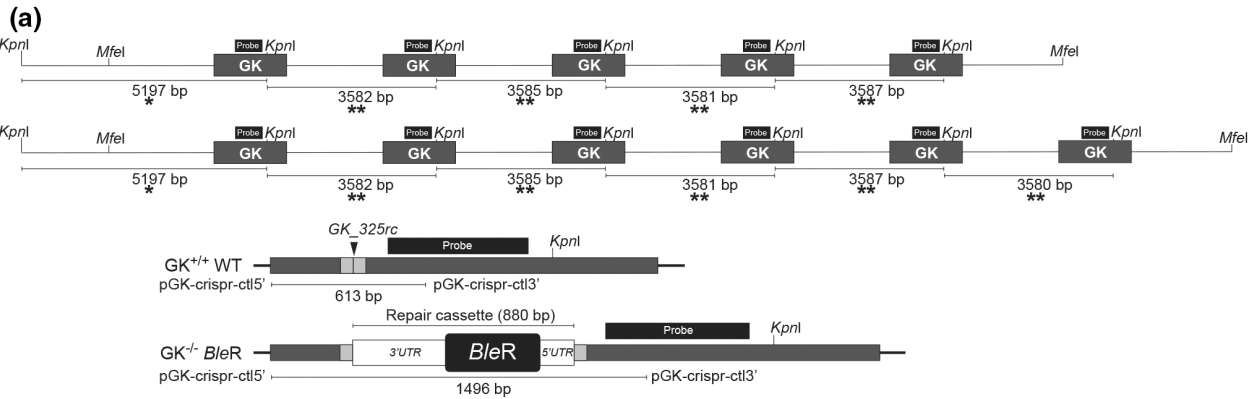
2.4 | *SpCas9* is also functional in other trypanosomatids

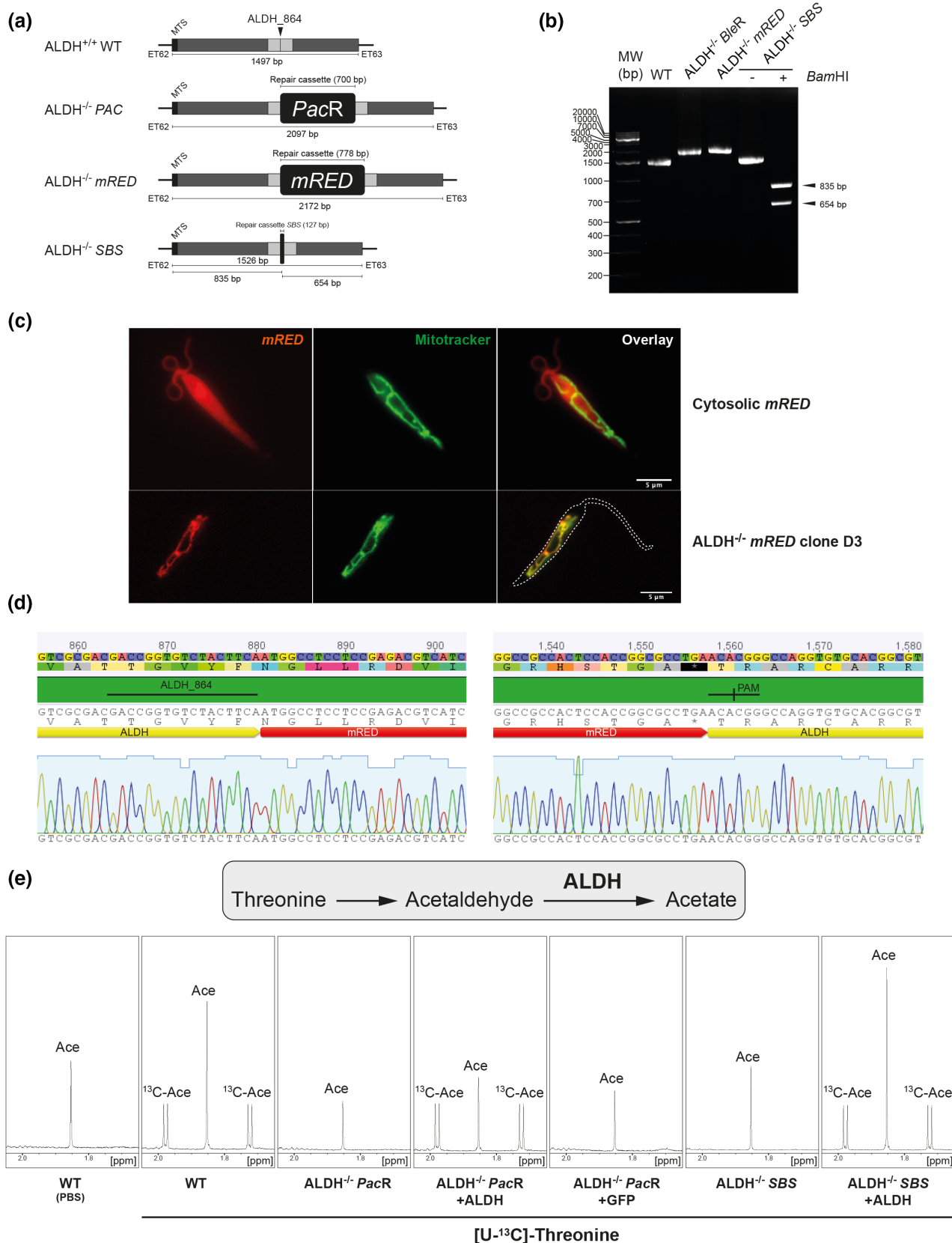
We also tested the efficiency of RNP complex delivery to edit the genome of the promastigote forms of *Leishmania infantum* and of the bloodstream and procyclic forms of *T. congolense*. Several approaches have been used to inactivate the gene encoding ALDH, the

FIGURE 3 Inactivation of the multigenic family encoding the glycerol kinase (GK) in *T. brucei* PCF. (a) Schematic representation of the two alleles of the GK family in *T. brucei* and the inactivation strategy used by insertion of the phleomycin resistance marker *BleR*. The position of the guide RNA is indicated by a vertical arrow (GK_325rc) and the 50-bp flanking sequences allowing repair through HDR are shown in gray. The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are depicted as white boxes. The position of the probe used for the southern-blot analysis is indicated by a black box. (b) Confirmation by PCR of GK gene inactivation on both alleles in PCF. PCR products from various phleomycin-resistant clones (primer pGK-crispr-ctl5'/pGK-crispr-ctl3') are analyzed on an agarose gel. (c) Southern blot analysis of various phleomycin-resistant clones. The two bands detected in the parental cells (WT) correspond to the GK copy located at the 5' extremity of the clusters (one asterisk) and to all the other GK copies (two asterisks). The insertion of the resistance marker increases the size of both of these bands by 880bp in the phleomycin-resistant clones. (d) Western blot analysis of whole-cell extracts from different phleomycin-resistant *T. brucei* PCF clones. RNAi targeting GK was included as a control (Pineda et al., 2018). The band revealed below the GK (indicated by an asterisk) is due to cross-reactivity with another protein (Pineda et al., 2018). Antibodies against the paraflagellar rod (PFR) were used as a loading control. (e) ¹H-NMR analysis of ¹³C-enriched end products (succinate and acetate, ¹³C-Suc, and ¹³C-Ace, respectively) excreted from the metabolism of [U-¹³C]-glucose and [U-¹³C]-glycerol, by the parental (WT) and clone 2E6 (GK^{-/-}) PCF cells. A portion of each spectrum ranging from 1.6 to 2.6 ppm is presented.

mitochondrial enzyme responsible for converting acetaldehyde to acetate in *L. infantum* promastigotes (LINF_250017300, ALDH), using a SpCas9/gRNA complex targeting the ALDH sequence and various

repair cassettes. Here we used repair cassettes to insert (i) a puromycin resistance marker (*PacR*), (ii) a fluorescent protein (monomeric RED, mRED), and (iii) a short sequence containing stop codons and





a *Bam*HI restriction site (SBS) as described above (Figure 4a). After transfection, clones were selected either by addition of puromycin (PacR cassette, ALDH^{-/-} PAC cells), by cell cytometry at 595/613 nm (mRED cassette, ALDH^{-/-} mRED cells) or by PCR and sequencing

after cell cloning (SBS cassette, ALDH^{-/-} SBS cells). In each condition, the insertion of the repair cassette was checked by PCR with primers flanking the insertion site (Figure 4a,b). We were able to obtain homozygous mutant clones for each repair cassette, with efficiencies

FIGURE 4 ALDH inactivation in *L. infantum* promastigote. (a) Schematic representation of the *ALDH* locus and the three inactivation strategies used, that is, insertion of the puromycin resistance marker (*PacR*), of the monomeric RED fluorescent protein (*mRED*) or of a short sequence containing a succession of stop codons (*SBS*). The position of the guide RNA is indicated by a vertical arrow (*ALDH_864*) and the 50-bp flanking sequences allowing repair through HDR are shown in gray. (b) Confirmation by PCR of *ALDH* gene inactivation on both alleles. PCR products from phleomycin-resistant, RED fluorescent and *SBS* clones (primer ET62/ET63) are analyzed on an agarose gel. In the case of the *SBS* strategy, the PCR product was digested by *Bam*HI. (c) mRED fluorescence was used to localized the chimeric *ALDH/mRED* (*ALDH*^{-/-} *mRED*, clone D3) and compared with the cytosolic expression of mRED. Mitochondrial localization of the chimeric protein was confirmed by labeling the cells with Mitotracker Green FM (Invitrogen). (d) Portion of the chromatogram showing the fusion of the mRED sequence with the *ALDH* sequence. (e) ¹H-NMR analysis of ¹³C-enriched end products (¹³C-acetate, ¹³C-Ace) excreted from metabolism of [U-¹³C]-threonine metabolism by the parental (WT), *ALDH*^{-/-} *PacR* clone 1B1 re-expressing (*ALDH*^{-/-} *PacR* + *ALDH*) or not the *ALDH* genes and *ALDH*^{-/-} *SBS* clone A1 re-expressing (*ALDH*^{-/-} *PacR* + *ALDH*) or not the *ALDH* gene. A rescue control was performed by expressing GFP in the *ALDH*^{-/-} *PacR* clone. A portion of each spectrum ranging from 1.65 to 2.05 ppm is presented.

ranging from 30% (*ALDH*^{-/-} *SBS* cells) to 83% (*ALDH*^{-/-} *mRED* cells) (Table 1). It should be noted that the *PacR* and *mRED* cassettes are only composed of the corresponding ORF inserted in frame with the *ALDH* coding sequence (Figure 4a). The *mRED* protein exhibited a fluorescence pattern resembling that of mitochondria, similar to Mitotracker labeling, in the *ALDH*^{-/-} *mRED* cell line, in contrast to the cytosolic-like pattern observed when *mRED* was expressed using an expression vector. This suggests that the mitochondria-targeting motif at the N-terminus of the *ALDH* protein directed the chimeric *ALDH/mRED* protein to the mitochondria (Figure 4c,d). To confirm that both *ALDH* alleles were indeed inactivated, we quantified the product of the *ALDH* enzymatic reaction, that is, acetate, which is excreted in the medium from the metabolism of threonine. As expected, the production of ¹³C-enriched acetate is abolished in the *ALDH*^{-/-} *PAC* clone 1B1, as shown by proton NMR spectrometry analysis of the ¹³C-enriched end products excreted from the metabolism of [U-¹³C]-threonine (Figure 4e) (Bringaud et al., 2015). Integrating an ectopic copy of the *ALDH* encoding gene in an *ALDH*^{-/-} *PAC* cell line restored ¹³C-enriched acetate production from the metabolism of [U-¹³C]-threonine, as opposed to expression of GFP (Figure 4e). Similarly, the *ALDH*^{-/-} *SBS* mutant (clone A1) no longer excretes ¹³C-enriched acetate from the metabolism of [U-¹³C]-threonine (Figure 4e).

To test this approach in *T. congolense*, we targeted the *LysoPLA* gene (TcIL3000.A.H_000623300), which is a non-essential gene encoding an excreted lysophospholipase in *T. brucei* (Monic et al., 2022; Tounkara et al., 2021). Repair cassettes containing either the phleomycin-resistant gene (*BleR*) flanked by 5' and 3' regulatory sequences or the marker-free *SBS* sequence were used to transfect BSF and PCF, respectively (Figure 5a). As above, the insertion of the repair cassettes was checked by PCR and sequencing from genomic DNA isolated from Phleomycin selection (*BleR* cassette) or cell cloning (*SBS* cassette). The four BSF clones tested are all homozygous mutants, further confirmed by western blot analyses using an anti-*LysoPLA* immune serum showing that *LysoPLA* is no longer expressed (Figure 5a-c). Similarly, three out of the five PCF clones tested are homozygous mutants (Figure 5d, clones 1B6, 1E10, and 2C3), as confirmed by western blot analyses (Figure 5e).

We also used *SpCas9* to inactivate the *GK* multigene family in *T. congolense*, which is composed of three *GK* copies per allele, one of which is a pseudogene with two frameshifts (Figure 6a,

TcIL3000_0_55170, TriTrypDB). BSF were transfected with a *SpCas9/gRNA* complex and a repair *BleR* cassette containing 5' and 3' regulatory sequences. Among the four clones tested, three were homozygote mutants and one was heterozygote (Figure 6b). The absence of *GK* expression was confirmed by western blot analyses using anti-*GK* antibodies (Figure 6c) and by quantitative proton NMR spectrometry analyses of excreted end products from the metabolism of [U-¹³C]-glycerol and glucose (Figure 6d). Indeed, the production of ¹³C-enriched succinate and acetate from the metabolism of [U-¹³C]-glycerol is abolished in a mutant cell line, while the conversion of non-enriched glucose to succinate and acetate is not affected (Figure 6d). In conclusion, our data clearly showed that transfection of RNP complexes containing *SpCas9* has the capacity to rapidly and efficiently modify all members of multigene families in *T. congolense* and probably all trypanosomatids.

3 | DISCUSSION

Since 2014, the majority of kinetoplastid studies using CRISPR/Cas9 technology have employed parasites that constitutively express Cas9. In the case of *Trypanosoma* species, this necessitated genome integration of the RNP-encoding gene, and in some instances, gRNAs into the genome. More recently, Soares Medeiros et al. (2017) demonstrated that transfection of the Cas9-gRNA RNP complex also induced rapid and efficient genome editing in kinetoplastids, but only with a Cas9 derived from *Staphylococcus aureus* and hypothesized that *SpCas9* was too large to be transfected and functional (Soares Medeiros et al., 2017). In this current study, we demonstrate that *SpCas9* is fully functional and effective after transfection into the parasites. We demonstrated that both the commercial *SpCas9* (IDT) and the *SpCas9* produced in our laboratory enable rapid and efficient genome modification in various kinetoplastids, including *T. brucei* and *T. congolense*, across different life cycle stages (insect and mammalian stages), as well as *Leishmania* promastigotes.

We have shown that both the commercial *SpCas9* (IDT) and the *SpCas9* produced in our laboratory enable rapid and efficient genome modification in several kinetoplastids including *T. brucei* and *T. congolense*, across different life cycle stages (insect and mammalian stages) and *Leishmania* promastigotes. We were able to target single genes and multigene families.

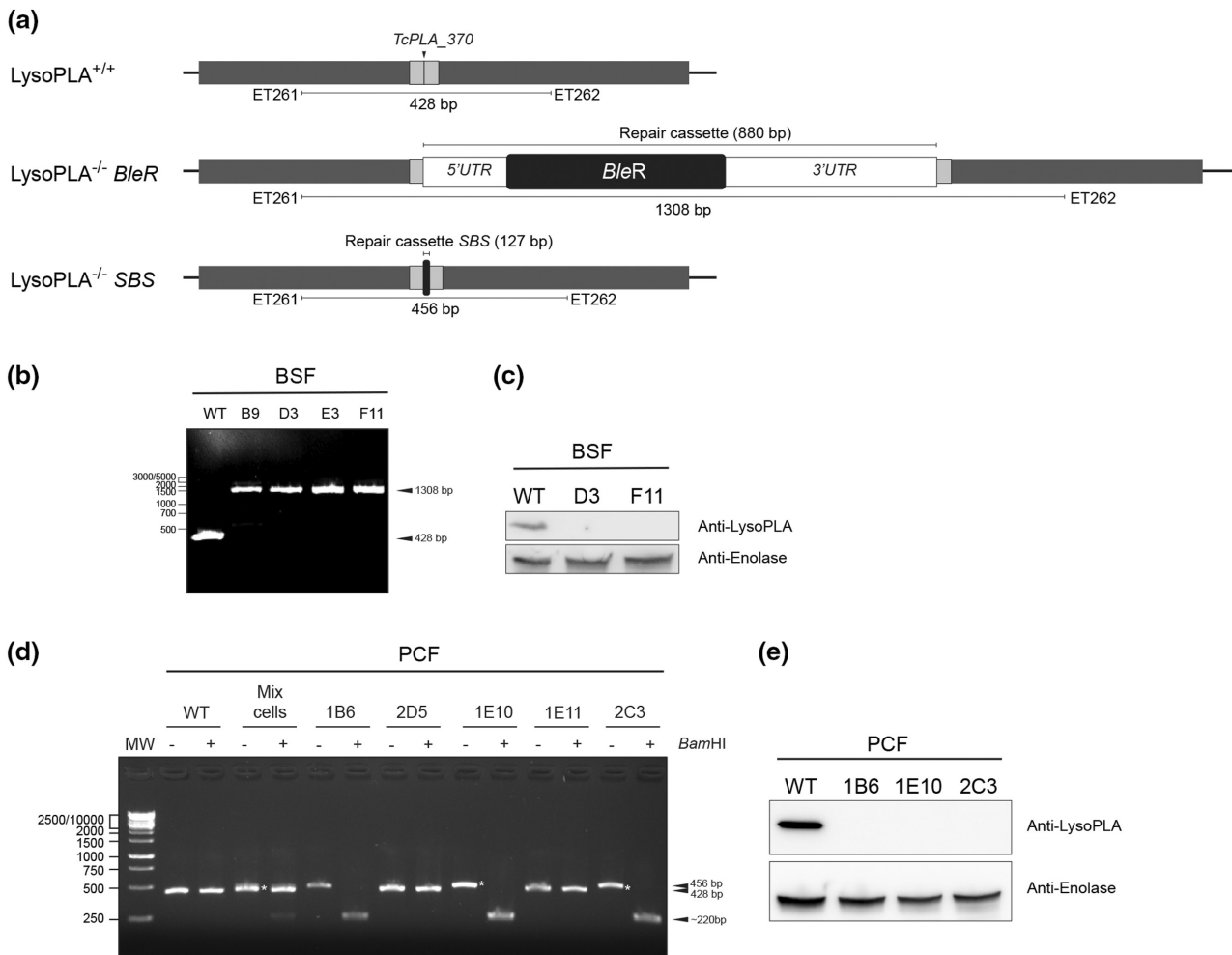
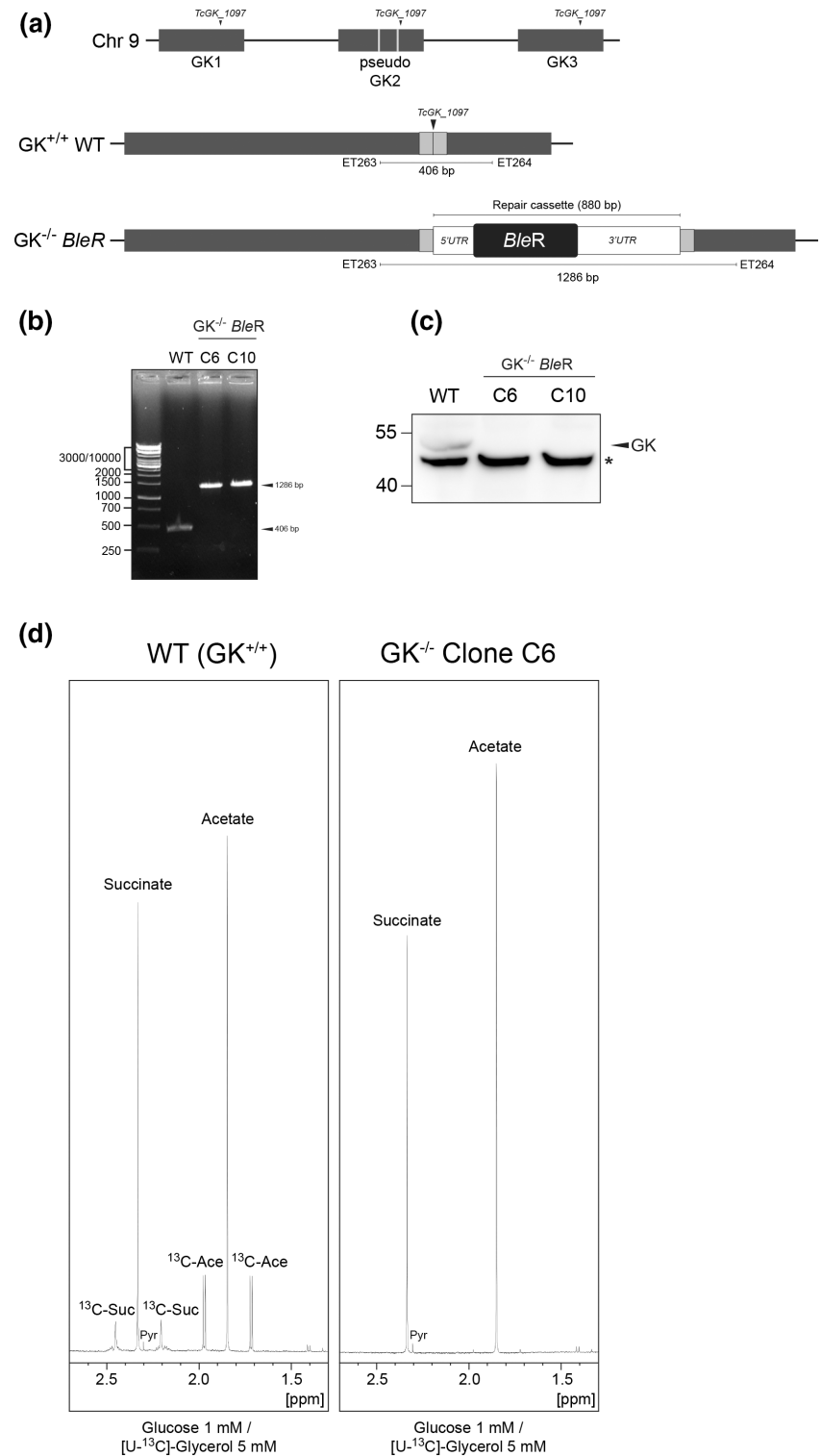


FIGURE 5 Inactivation of the *LysoPLA* in *T. congolense* BSF and PCF. (a) Schematic representation of the *LysoPLA* locus in *T. congolense* and the two inactivation strategies used, that is, insertion of the phleomycin resistance marker (*BleR*) or a short sequence containing a succession of stop codons (SBS). The position of the guide RNA is indicated by a vertical arrow (*TcPLA_370*) and the 50-bp flanking sequences allowing repair through HDR are shown in gray. The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are depicted as white boxes. (b) Confirmation of *LysoPLA* gene inactivation on both alleles in *T. congolense* BSF cells, by PCR analysis of various phleomycin-resistant clones (primer ET261/ET262). (c) Western blot analysis of whole-cell extracts from two phleomycin-resistant *T. congolense* BSF clones. Antibodies against enolase were used as a loading control. (d) Confirmation of *LysoPLA* gene inactivation on both alleles in *T. congolense* PCF cells by agarose gel analysis of *Bam*HI-digested PCR products from various phleomycin-resistant clones (primer ET261/ET262). The "Mix cells" lane corresponds to the cell population before cloning, containing parental cells, and heterozygous and homozygous mutants. The asterisk indicates the 456-bp band, which does include a *Bam*HI restriction site. Clones 2D5 and 1E11 exhibit the wild-type profile. (e) Western blot analysis of whole-cell extracts from marker-free (SBS) *T. congolense* PCF clones. Antibodies against enolase were used as a loading control.

This approach based on transfection of RNP complexes offers several advantages including, (i) adaptability to any laboratory, (ii) for non-essential genes, both alleles are inactivated simultaneously, which is also valid for large multigene families, (iii) Cas9 remains transiently in the transfected cell, preventing them from the deleterious effect of constitutive Cas9 expression, and (iv) no need for selection markers, which implies that numerous modifications can be achieved in the same cell line. Peng et al. (2014) demonstrated that mutations induced by Cas9 were mediated by MMEJ, a process that results in a deletion between homologous regions (Peng et al., 2014). The prediction of MMEJ sites is made very easy through the Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool (EuPaGDT) website (Peng & Tarleton, 2015). Enabling the optional

search for microhomology allows for the exploration of microhomology pairs bracketing each gRNA. These microhomology pairs can facilitate the joining of double-stranded breaks even in the absence of a repair template. We have also observed such deletions in *T. brucei* with both the commercial *SpCas9* (from IDT) and laboratory-produced *SpCas9*, in the absence of repair cassettes. This approach proved to be very efficient since we successfully inactivated the sole allele of the *GFP* gene introduced in *T. brucei* PCF with an efficiency close to 50%, all within a few days. When double-strand breaks through Cas9 are combined with repair cassettes, it becomes easy to achieve targeted insertions through HDR, allowing inactivation or tagging of genes at their endogenous loci. We have thus been able to insert resistance markers (*BleR* and *PacR*), a gene encoding

FIGURE 6 Inactivation of the multigenic family encoding the glycerol kinase (GK) in *T. congolense* BSF. (a) Schematic representation of the GK locus and its inactivation by inserting the phleomycin resistance marker *BleR*. The position of the guide RNA is indicated by a vertical arrow (*TcGK_1097*) and the 50-bp flanking sequences allowing repair through HDR are shown in gray. The 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are depicted as white boxes. (b) PCR confirmation of *GK* gene inactivation on both alleles in two different BSF clones. (c) Western blot analysis of whole-cell extracts from two phleomycin-resistant *T. congolense* BSF clones. The band revealed below the GK (indicated by an asterisk) is due to cross-reactivity with another protein. (d) ^1H -NMR analysis of end products (succinate and acetate) excreted from the metabolism of glucose and $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -glycerol by the parental (WT) and clone C6 ($\text{GK}^{-/-}$) BSF cell lines. A portion of each spectrum ranging from 1.3 to 2.7 ppm is presented. In the NMR experiments, *T. congolense* BSF were incubated in the presence of a mixture of D-glucose (1 mM) and D- $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -glycerol (5 mM) to keep them alive. Resonances were assigned as follows: Ace, acetate; ^{13}C -Ace, ^{13}C -enriched acetate; Suc, succinate; ^{13}C -Suc, ^{13}C -enriched succinate; Pyr, pyruvate.



the RED fluorescent protein, or a short insertion sequence containing a series of stop codons enabling the inactivation of the target gene. We did not test the limit for the homology arms' size, but in *T. cruzi* and *Leishmania*, approximately 30bp is sufficient (Beneke et al., 2017; Espada et al., 2021; Soares Medeiros et al., 2017; Zhang et al., 2017; Zhang & Matlashewski, 2015). Finally, the insertion of short coding sequences at the 5' and/or 3' ends of the targeted genes (in order to tag them) can be achieved on both alleles without

a selection marker and without significant modification of the UTRs (Morel et al., 2023). In terms of efficiency, there appears to be no set rule, that is, it may depend on the gRNA, the targeted gene, the stage of division, and how the parasites are selected. It should be noted that we tested, in *T. brucei* PCF, inactivation cassettes containing or not regulatory sequences at the 5' and 3' ends of the genes used for selection (in this case, phleomycin). In both cases (with or without UTR), we obtained resistant clones. This suggests that in

the absence of regulatory sequences at the 5' and 3' ends of the resistance gene, it is expressed from the regulatory sequences of the inactivated gene. This is also the case in *Leishmania*, where we obtained cells resistant to phleomycin but also fluorescent with mRED expression. In this latter case, the gene encoding mRED is in phase with the N-terminal sequence of the ALDH protein, resulting in a chimeric protein targeting the mRED to the mitochondria but inactivating the ALDH protein (Table 1). In *T. cruzi*, successive transfections appear to significantly increase efficiency (Soares Medeiros et al., 2017), and this is an interesting approach when homozygous clones are not obtained. Here, we consistently obtained homozygous clones for non-essential genes. However, for genes suspected to be essential, only heterozygous clones could be obtained. Thus, the consistent acquisition of exclusively heterozygous clones after successive transfections could suggest the potential essentiality of the gene. Confirming this hypothesis will be necessary through other approaches, such as RNA interference (RNAi), for example. It should be noted that successive transfections may also lead to the selection of chromosomal polysomy in *Leishmania* (Tovar et al., 1998).

Another important point to consider is the optimization of Cas9 for its importation by electroporation. Soares Medeiros et al. (2017) reported that recombinant SpCas9 is not active on *T. cruzi*, which was interpreted as non-internalization by electroporation due to a size issue (Soares Medeiros et al., 2017). In agreement with their hypothesis, they showed the functionality of a smaller Cas9 (Cas9 from *Staphylococcus aureus*), which is abolished by fusion with GFP (Soares Medeiros et al., 2017). However, the recombinant SpCas9 is functional in the same experimental set-up. The only difference between the recombinant SpCas9 used by Soares Medeiros et al. (2017) and us is the presence of 2 and 3 NLS sequences, respectively. These data suggest that the size of the ribonucleoprotein complex is not a limiting factor, however, the number of NLS sequences to achieve effective nuclear targeting seems to be an important factor to consider. Very recently, Minet et al. also managed to transfect and modify *T. congolense* bloodstream forms using a commercial SpCas9, which contains three NLS in its sequence, further demonstrating that this protein is fully functional in kinetoplastids (Minet et al., 2023).

Finally, this system is likely functional in all cells that can be transfected, enabling more relevant studies on field strains. Indeed, this system is also valuable for studying cells that are difficult to cultivate (low cell density) and that previously required a significant number of cells for transfection through classical homologous recombination approaches. We used 5×10^5 cells to efficiently edit both alleles of the targeted genes, but we believe that this approach could be adapted to many fewer cells, provided that a sufficient number of clonal cells are sorted by flow cytometry. The transfection of the RNP-gRNA complex and its various derivatives, including dead Cas9, dCas9-methyltransferases, activators, etc., presents a wealth of exciting research opportunities across diverse cell types (Engstler & Beneke, 2023; Gomas et al., 2022). Notably, this approach holds great promise for advancing our understanding of biological processes showing several redundant pathways, such as some metabolic capacities

(Millieroux et al., 2018; Wargnies et al., 2018), for which the need to inactivate multiple enzymes has often been hampered by the scarcity of selection markers.

4 | EXPERIMENTAL PROCEDURES

4.1 | Trypanosomes and cell cultures

The procyclic forms (PCF) of *T. brucei* EATRO1125.T7T (TetR-HYG-T7RNAPOL-NEO, where TetR stands for tetracycline resistance, HYG for hygromycin, T7RNAPOL for RNA polymerase T7, and NEO for neomycin) was cultured at 27°C with 5% CO₂ in SDM79 medium containing 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 5 µg/mL hemin, 0.04 mg/mL streptomycin, 40 U/mL penicillin (SigmaP4333), 25 µg/mL hygromycin, and 10 µg/mL neomycin. The bloodstream forms (BSF) of *T. brucei* 427 90-13 (TetR-HYG-T7RNAPOL-NEO) was cultured at 37°C with 5% CO₂ in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM) supplemented with 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 0.2 mM β-mercaptoethanol, 36 mM NaHCO₃, 1 mM hypoxanthine, 0.16 mM thymidine, 1 mM sodium pyruvate, 0.05 mM bathocuproine, 1.5 mM L-cysteine, 5 µg/mL hygromycin, and 2.5 µg/mL neomycin. *L. infantum* 263 promastigote form was cultured at 27°C with 5% CO₂ in SDM79 medium containing 10% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 5 µg/mL hemin, 0.04 mg/mL streptomycin, and 40 U/mL penicillin (SigmaP4333). The BSF of *T. congolense* IL3000 was cultured at 34°C with 5% CO₂ in MEM medium (Sigma M0643) containing 20% (vol/vol) heat-inactivated goat serum (InvitroGen 16210072), 6 mg/mL HEPES, 2 mg/mL NaHCO₃, 1 mg/mL glucose, 100 µg/mL sodium pyruvate, 10 µg/mL adenosine, 14 µg/mL hypoxanthine, 4 µg/mL thymidine, 14 µg/mL bathocuproine, 2 mM glutamine and 0.2 mM β-mercaptoethanol, pH 7.2-7.4. The PCF of *T. congolense* was cultured at 27°C with 5% CO₂ in MEM medium (Sigma M0643) containing 20% (vol/vol) heat-inactivated fetal calf serum, 6 mg/mL HEPES, 2 mg/mL NaHCO₃, 5 µg/mL hemin, 2 mM glutamine and 8 mM Proline, pH 7.3-7.4. Growth was monitored by daily cell counting with the cytometer Guava® Muse® or Guava® easyCyte™.

4.2 | CRISPR/Cas9 inactivation

Gene inactivation was achieved by inserting double-stranded DNA corresponding either to a resistance marker (phleomycin or puromycin), to a gene encoding a fluorescent protein (monomeric RED), or to a short sequence containing six successive stop codons in the three reading phases and a BamHI restriction site. These double-stranded DNA fragments were also flanked by 50bp homologous to the 5' and 3' sequences of the Cas9 cut site. Prior to transfection, equal quantities (0.4 µmol each) of TracrRNA and gRNA from IDT were combined. The mixture was then heated at 95°C for 5 min and gradually cooled to room temperature. Subsequently, this mixture was combined with 30 µg of SpCas9 sourced from IDT (Alt-RTM SpCas9

Nuclease 3NLS, Catalog #1074181) or purified in the laboratory. 5×10^5 cells were respectively transfected, using Amaxa nucleofector II (100 μ L), with 1 μ g of purified cassette (phleomycin or puromycin resistance marker, mRED or StopBamHIStop in a final volume of 10 μ L) and 30 μ g of Cas9 protein preloaded with the mixture of TracrRNA and gRNA. Cells were transfected using program X-001 for *T. brucei* PCF and BSF or U-033 for *L. infantum* promastigote and *T. congolense* PCF and BSF and resuspended in 5 mL of medium containing or not phleomycin (for *T. brucei* PCF 5 μ g/mL or BSF 2.5 μ g/mL and for *T. congolense* PCF 2.5 μ g/mL or BSF 5 μ g/mL) or puromycin (*T. brucei* PCF 1 μ g/mL and *Leishmania* promastigote 100 μ g/mL). Following a 2-day culture period, a portion of the transfected cells underwent DNA extraction using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel) followed by PCR amplification using primers that flank the Cas9 cleavage site (Table S1). Gel analysis of the PCR products is expected to show two bands corresponding to the wild-type and modified gene, as illustrated in Figure 5d for mixed cells. Cells were subsequently cloned using a cell sorter (TBM Core facility), and the selection of inactivated cells was performed by DNA extraction using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel) followed by PCR amplification using primers flanking the Cas9 cleavage site as previously described. Guide RNA was designed using EuPaGDT (Peng & Tarleton, 2015), from <http://tritypdb.org>. Primers and guide RNA used were synthesized by Integrated DNA Technologies (IDT) and listed in Tables S1 and S2.

4.3 | Southern blot

A total of 2.5 μ g of genomic DNA from *T. brucei* (EATRO1125.T7T) were subjected to *KpnI* or *MfeI* digestion, electrophoresed in 0.8% agarose gel, blotted onto Hybond N⁺ membrane (Amersham), and hybridized with labeled probe at 50°C in 6X SSPE (1X SSPE: 0.18M NaCl, 10mM NaH₂PO₄, 1mM ethylenediaminetetraacetate, pH7.0), 0.1% SDS and washed at 50°C using 0.5X SSPE-0.1% SDS, before revelation. Probes were obtained by PCR using the primers pGK-S55 and pGK-S53 (Table S1) and labeled with the PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche) according to the manufacturer and revealed using the DIG Luminescent Detection Kit and DIG Easy Hyb (Roche).

4.4 | Western blot

Total protein extracts (5×10^6 cells) were separated by SDS-PAGE (10%) and immunoblotted on TransBlot Turbo Midi-size PVDF Membranes (Bio-Rad). Immunodetection was performed using the primary antibodies, diluted in PBS-Tween-Milk (0.05% Tween20, 5% skimmed milk powder), rabbit anti-GK (1:1000), rabbit anti-LysoPLA (1:1000) and mouse anti-enolase (1:100,000, gift from P.A.M. Michels, Edinburgh, UK). Revelation was performed using a second antibody coupled to the HRP (anti-rabbit or anti-mouse IgG conjugated to horseradish peroxidase, Bio-Rad, 1:5000 dilution) and detected using the Clarity Western-enhanced chemiluminescence (ECL) substrate as describes

by the manufacturer (Bio-Rad). Images were acquired and analyzed with the ImageQuant Las 4000 luminescent image analyzer.

4.5 | Mitochondria staining on living cells

Mitotracker Green FM (10nM, MP07510 from Invitrogen) was added to cells previously washed with PBS (5×10^6 – 1×10^7 cells per mL) for 10min at room temperature, then cells were washed twice with PBS and spread on slides. Images were acquired with MetaMorph software on Zeiss Axioplan 2 microscope and processed with ImageJ.

4.6 | Immunofluorescence

Cells were washed twice with PBS, then fixed with 2% paraformaldehyde (PFA) for 10min at room temperature and 0.1mM glycine was added for 10min to stop the reaction. The cells were spread on slides and permeabilized with 0.05% triton X-100. After incubation in PBS containing 4% bovine serum albumin (BSA) for 20min, cells were incubated for 1h with primary antibodies diluted in PBS-BSA 4%, washed four times with PBS and incubated for 45min with secondary antibodies diluted in PBS-BSA 4% followed by three washes. Kinetoplasts and nuclei were then labeled with DAPI (10 μ g/mL) for 5min. Slides were washed three times with PBS and mounted with SlowFade Gold (Molecular probes). Single plane images were acquired with MetaMorph software on widefield Zeiss Imager Z1 or Axioplan 2 microscopes with a 100 \times objective (NA 1.4) and processed without further treatment with ImageJ.

4.7 | Analysis of excreted end-products from the metabolism of carbon sources by proton ¹H-NMR

2 to 4×10^7 *T. brucei* PCF, *Leishmania* promastigote or *T. congolense* BSF cells were collected by centrifugation at 1400 \times g for 10min, washed twice with phosphate-buffered saline supplemented with 2g/L NaHCO₃ (pH7.4), and incubated in 1mL (single point analysis) of PBS supplemented with 2g/L NaHCO₃ (pH7.4). Cells were maintained for 6h at 27°C in incubation buffer containing one ¹³C-enriched carbon source (1mM, [U-¹³C]-Glucose or [U-¹³C]-Glycerol or [U-¹³C]-Threonine; U stands for "uniformly ¹³C-labeled"), except for *T. congolense* BSF, which were incubated for only 1h30 at 37°C. The integrity of the cells during the incubation was checked by microscopic observation. The supernatant (1mL) was collected and 50 μ L of maleate solution in Deuterated water (D₂O; 10mM) was added as an internal reference. ¹H-NMR spectra were performed at 500.19MHz on a Bruker Avance III 500 HD spectrometer equipped with a 5mm cryoprobe Prodigy. Measurements were recorded at 25°C. Acquisition conditions were as follows: 90° flip angle, 5000Hz spectral width, 32K memory size, and 9.3s total recycle time. Measurements were performed with 64 scans for a total time close to 10min 30s.

4.8 | Cas9 cloning, expression and purification Cas9

The *eSpCas9(1.1)* gene containing two nuclear localization signals (NLS) was obtained from Addgene (Plasmid #71814) and cloned into the pST32 vector, which contains two N-terminal and C-terminal His-tag (Gift from Fanny Boissier, INSERM U1212 CNRS 5320, University of Bordeaux), using the *NcoI* and *EcoRI* restriction sites. A third nuclear localization signal (SV40) was added by hybridization of two complementary primers (Table S1) containing the SV40 NLS and cloned in frame at the 3' end of the pST32-*eSpCas9(1.1)* vector using *EcoRI* and *XhoI* restriction sites, generating the vector pST32-*eSpCas9(1.1)*-3NLS (Figure 1b). The plasmid was then transformed into *E. coli* Rosetta 2(DE3) competent cells (Novagen).

A bacterial preculture was grown overnight at 37°C with shaking and used to inoculate 100 mL of LB-Miller medium (peptone 10 g, yeast-extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7). The culture was grown at 37°C with shaking to an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of 0.6 to 0.8. Protein expression was induced by adding isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG; 100 μM), and the culture was kept at 18°C with shaking overnight. Cells were harvested by centrifugation, and the pellet was resuspended in 10 mL lysis buffer containing 500 mM KCl, 20 mM Hepes, 5 mM imidazole, pH 7.5 and protease inhibitor cocktail without EDTA (Merck). After lysis by sonication (20 sec, four times), the soluble fraction was obtained by centrifugation (30,000 × g, 30 min at 4°C) and purified by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC) using a His-Select Nickel Affinity Gel (Sigma) in a fast protein liquid chromatography (FPLC) system (ÄKTA; GE Healthcare Life Sciences). All chromatographic steps were performed at 4°C. 2 mL of His-Select Nickel resin were equilibrated in buffer and packed in a XK 10/50 mm column housing (Omnifit) with 20 mL lysis buffer. The cleared lysate was loaded on the column using a syringe at 1 mL/min rate. The column with bound protein was washed first with buffer (20 mM Hepes, 500 mM KCl, 50 mM imidazole, pH 7.5) until the absorbance returned to baseline again. The protein was eluted by applying a gradient from 0% to 100% elution buffer (20 mM Hepes, 500 mM KCl, 1 M imidazole, pH 7.5) over 20 mL and collected in 2 mL fractions. All peak fractions were analyzed for the presence of *eSpCas9(1.1)*-3NLS using SDS-PAGE, and the purity was estimated to be ~80% based on band intensity (Figure S1). An alternative to the ÄKTA purification was to purify the Cas9 protein in batches using Ni²⁺-resin and incubate for 30 min at 4°C. The resin was washed three times with 50 mM imidazole in 500 mM NaCl, Tris-HCl pH 8 and 3 times with 250 mM imidazole in 500 mM NaCl, Tris-HCl pH 8. *eSpCas9(1.1)*-3NLS was eluted with 500 mM imidazole in 500 mM NaCl, Tris-HCl pH 8. Fractions were analyzed by SDS-PAGE. The elution buffer was then exchanged for storage buffer (20 mM HEPES-KOH, 500 mM KCl, 1 mM DTT, pH 7.5) while concentrating the protein to a volume <1.5 mL using a 50,000 MWCO concentrator (Amicon) at 4000 × g. Buffer exchange prevented precipitation in the concentrator. The concentrated fraction was then centrifuged for 10 min at 16,900 × g at 4°C to remove all precipitated material. The protein concentration was determined

using a bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Thermo Scientific), and the yield was determined to be approximately 5 mg/100 mL of bacteria culture.

4.9 | Statistical analysis

Experiments were performed at least in triplicates. Statistical analyses were performed using Prism (GraphPad) software. The results are presented as mean ± SD. A two-tailed student's *t*-test (unpaired, normal distribution, and parametric test) was used to determine statistical differences against the indicated group (confidence interval 95%—*p*-value style: 0.1234 (ns); 0.0332 (*); 0.0021 (**); 0.0002 (**); <0.0001 (****)).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Emmanuel Tetaud: Conceptualization; methodology; formal analysis; supervision; validation; writing – original draft; writing – review and editing. **Corinne Asencio:** Methodology; formal analysis; writing – review and editing. **Perrine Hervé:** Methodology; formal analysis; writing – review and editing. **Pauline Morand:** Methodology; formal analysis. **Quentin Oliveres:** Methodology; formal analysis. **Chloé Alexandra Morel:** Methodology; formal analysis; writing – review and editing. **Valérie Prouzet-Mauleon:** Conceptualization; writing – review and editing. **Marc Biran:** Methodology; conceptualization; formal analysis; writing – review and editing. **Sarah Monic:** Methodology; formal analysis. **Mélanie Bonhivers:** Conceptualization; funding acquisition; writing – review and editing. **Derrick Roy Robinson:** Conceptualization; funding acquisition; writing – review and editing. **Marc Ouellette:** Conceptualization; writing – review and editing; supervision. **Loïc Rivière:** Conceptualization; writing – review and editing; supervision. **Frédéric Bringaud:** Conceptualization; funding acquisition; writing – original draft; validation; supervision; writing – review and editing.

ACKNOWLEDGMENTS

Cell sorter analyses were performed at the TBMCore facility (FACSility) on BD FACSAria™ III Sorter and we thank Atika Zouine and Vincent Pitard for technical assistance, data acquisition, and interpretation (TBMCore CNRS 3427, INSERM US005, Université de Bordeaux). We also thank the CRISPR'edit platform for their valuable advice during the setup of the CRISPR system. We thank Keith Gull (University of Manchester) for providing us with the anti-PFR antibody. The Bringaud and Robinson teams are supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, <https://www.cnrs.fr/>), the Université de Bordeaux (<https://www.u-bordeaux.fr/>) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR, <https://anr.fr/>) through the ParaFrap "Laboratoire d'Excellence" (LabEx, <https://www.enseignementsup-recherche.gouv.fr/cid51355/laboratoires-d-excellence.html>) (ANR-11-LABX-0024). This work was supported by the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM, <https://www.frm.org/>) ("Equipe FRM", grant n°EQU201903007845) and the ANR grant ADIPOTRYP (ANR19-CE15-0004-01) to FB, and by the ANR

grants Structu-Ring (ANR-20-CE91-0003) and Flagel-Ome (ANR-19-CE17-0014-03) to MB. MO is the holder of a Canada Research Chair and the recipient of a CIHR Foundation Grant. He was the holder of a University de Bordeaux IDEX fellowship.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there is no conflict of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are openly available in [10.1101/2023.10.25.563974](https://doi.org/10.1101/2023.10.25.563974) at <https://biorxiv.org/cgi/content/short/2023.10.25.563974v1>.

ETHICS STATEMENT

No human or animal subjects were used in this study.

ORCID

Emmanuel Tetaud  <https://orcid.org/0000-0001-9575-8671>

REFERENCES

- Allmann, S., Wargnies, M., Plazolles, N., Cahoreau, E., Biran, M., Morand, P. et al. (2021) Glycerol suppresses glucose consumption in trypanosomes through metabolic contest. *PLoS Biology*, 19, e3001359.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S. et al. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315, 1709–1712.
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J. & Gluenz, E. (2017) A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplasts. *Royal Society Open Science*, 4, 170095.
- Boutin, J., Rosier, J., Cappellen, D., Prat, F., Toutain, J., Pennamen, P. et al. (2021) CRISPR-Cas9 globin editing can induce megabase-scale copy-neutral losses of heterozygosity in hematopoietic cells. *Nature Communications*, 12, 4922.
- Bringaud, F., Biran, M., Millerioux, Y., Wargnies, M., Allmann, S. & Mazet, M. (2015) Combining reverse genetics and nuclear magnetic resonance-based metabolomics unravels trypanosome-specific metabolic pathways. *Molecular Microbiology*, 96, 917–926.
- Coustou, V., Plazolles, N., Guegan, F. & Baltz, T. (2012) Sialidases play a key role in infection and anaemia in *Trypanosoma congolense* animal trypanosomiasis. *Cellular Microbiology*, 14, 431–445.
- Crawford, E.D., Quan, J., Horst, J.A., Ebert, D., Wu, W. & Derisi, J.L. (2017) Plasmid-free CRISPR/Cas9 genome editing in *Plasmodium falciparum* confirms mutations conferring resistance to the dihydroisoquinoline clinical candidate SJ733. *PLoS ONE*, 12, e0178163.
- D'Astolfo, D.S., Pagliero, R.J., Pras, A., Karthaus, W.R., Clevers, H., Prasad, V. et al. (2015) Efficient intracellular delivery of native proteins. *Cell*, 161, 674–690.
- Desquesnes, M., Sazmand, A., Gonzatti, M., Boulange, A., Bossard, G., Thevenon, S. et al. (2022) Diagnosis of animal trypanosomes: proper use of current tools and future prospects. *Parasites & Vectors*, 15, 235.
- Engstler, M. & Beneke, T. (2023) Gene editing and scalable functional genomic screening in *Leishmania* species using the CRISPR/Cas9 cytosine base editor toolbox LeishBASEdit. *eLife*, 12, e85605.
- Espada, C.R., Quilles, J.C., Jr., Albuquerque-Wendt, A., Cruz, M.C., Beneke, T., Lorenzon, L.B. et al. (2021) Effective genome editing in *Leishmania (Viannia) braziliensis* stably expressing Cas9 and T7 RNA polymerase. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 772311.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K. et al. (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31, 822–826.
- Gomaa, F., Li, Z.H., Beaudoin, D.J., Alzan, H., Girguis, P.R., Docampo, R. et al. (2022) CRISPR/Cas9-induced disruption of *Bodo saltans* paraflagellar rod-2 gene reveals its importance for cell survival. *Environmental Microbiology*, 24, 3051–3062.
- Imamura, H., Downing, T., Van Den Broeck, F., Sanders, M.J., Rijal, S., Sundar, S. et al. (2016) Evolutionary genomics of epidemic visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *eLife*, 5, e12613.
- Inoue, N., Otsu, K., Ferraro, D.M. & Donelson, J.E. (2002) Tetracycline-regulated RNA interference in *Trypanosoma congolense*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 120, 309–313.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169, 5429–5433.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J. & Kim, J.S. (2014) Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24, 1012–1019.
- Kolev, N.G., Tschudi, C. & Ullu, E. (2011) RNA interference in protozoan parasites: achievements and challenges. *Eukaryotic Cell*, 10, 1156–1163.
- Kovarova, J., Novotna, M., Faria, J., Rico, E., Wallace, C., Zoltner, M. et al. (2022) CRISPR/Cas9-based precision tagging of essential genes in bloodstream form African trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 249, 111476.
- Lander, N., Chiurillo, M.A., Storey, M., Vercesi, A.E. & Docampo, R. (2016) CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of *Trypanosoma cruzi* genes reveals the acidocalcisome localization of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 291, 25505–25515.
- Lander, N., Chiurillo, M.A., Vercesi, A.E. & Docampo, R. (2017) Endogenous C-terminal tagging by CRISPR/Cas9 in *Trypanosoma cruzi*. *Bio-Protocol*, 7, e2299.
- Lander, N., Li, Z.H., Niyogi, S. & Docampo, R. (2015) CRISPR/Cas9-induced disruption of paraflagellar rod protein 1 and 2 genes in *Trypanosoma cruzi* reveals their role in flagellar attachment. *MBio*, 6, e01012.
- Liang, X., Potter, J., Kumar, S., Zou, Y., Quintanilla, R., Sridharan, M. et al. (2015) Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208, 44–53.
- Lye, L.F., Owens, K.L., Jang, S., Marcus, J.E., Brettmann, E.A. & Beverley, S.M. (2022) An RNA interference (RNAi) toolkit and its utility for functional genetic analysis of *Leishmania (Viannia)*. *Genes (Basel)*, 14, 93.
- Mannaert, A., Downing, T., Imamura, H. & Dujardin, J.C. (2012) Adaptive mechanisms in pathogens: universal aneuploidy in leishmania. *Trends in Parasitology*, 28, 370–376.
- Millerioux, Y., Mazet, M., Bouyssou, G., Allmann, S., Kiema, T.R., Bertiaux, E. et al. (2018) De novo biosynthesis of sterols and fatty acids in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: carbon source preferences and metabolic flux redistributions. *PLoS Pathogens*, 14, e1007116.
- Minet, C., Chantal, I. & Berthier, D. (2023) Recent advances in genome editing of bloodstream forms of *Trypanosoma congolense* using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins: proof of concept. *Experimental Parasitology*, 252, 108589.
- Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60, 174–182.
- Monic, S.G., Lamy, A., Thonnus, M., Bizarra-Rebello, T., Bringaud, F., Smith, T.K. et al. (2022) A novel lipase with dual localisation in *Trypanosoma brucei*. *Scientific Reports*, 12, 4766.
- Morel, C.A., Asencio, C., Blancard, C., Salin, B., Gontier, E., Duvezin-Caubet, S. et al. (2023) Identification of a novel and

- ancestral machinery involved in mitochondrial membrane branching in *Trypanosoma brucei*. *bioRxiv*. Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.06.28.546890>
- Mozdy, A.D., Mccaffery, J.M. & Shaw, J.M. (2000) Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *The Journal of Cell Biology*, 151, 367–380.
- Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. & Ullu, E. (1998) Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 14687–14692.
- Peng, D., Kurup, S.P., Yao, P.Y., Minning, T.A. & Tarleton, R.L. (2014) CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. *MBio*, 6, e02097-14.
- Peng, D. & Tarleton, R. (2015) EuPagdt: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. *Microbial Genomics*, 1, e000033.
- Pineda, E., Thonnus, M., Mazet, M., Mourier, A., Cahoreau, E., Kulyk, H. et al. (2018) Glycerol supports growth of the *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in the absence of glucose: analysis of metabolic adaptations on glycerol-rich conditions. *PLoS Pathogens*, 14, e1007412.
- Reis-Cunha, J.L., Valdivia, H.O. & Bartholomeu, D.C. (2018) Gene and chromosomal copy number variations as an adaptive mechanism towards a parasitic lifestyle in trypanosomatids. *Current Genomics*, 19, 87–97.
- Rico, E., Jeacock, L., Kovarova, J. & Horn, D. (2018) Inducible high-efficiency CRISPR-Cas9-targeted gene editing and precision base editing in African trypanosomes. *Scientific Reports*, 8, 7960.
- Rogers, M.B., Hillel, J.D., Dickens, N.J., Wilkes, J., Bates, P.A., Depledge, D.P. et al. (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Research*, 21, 2129–2142.
- Ryan, O.W., Skerker, J.M., Maurer, M.J., Li, X., Tsai, J.C., Poddar, S. et al. (2014) Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife*, 3, e03703.
- Shaw, S., Knusel, S., Hoenner, S. & Roditi, I. (2020) A transient CRISPR/Cas9 expression system for genome editing in *Trypanosoma brucei*. *BMC Research Notes*, 13, 268.
- Slaymaker, I.M., Gao, L., Zetsche, B., Scott, D.A., Yan, W.X. & Zhang, F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 351, 84–88.
- Soares Medeiros, L.C., South, L., Peng, D., Bustamante, J.M., Wang, W., Bunkofsky, M. et al. (2017) Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *MBio*, 8, e01788-17.
- Sollelis, L., Ghorbal, M., Macpherson, C.R., Martins, R.M., Kuk, N., Crobu, L. et al. (2015) First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in leishmania parasites. *Cellular Microbiology*, 17, 1405–1412.
- Toukara, M., Boulange, A., Thonnus, M., Bringaud, F., Belem, A.M.G., Bengaly, Z. et al. (2021) Novel protein candidates for serodiagnosis of African animal trypanosomiasis: evaluation of the diagnostic potential of lysophospholipase and glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 15, e0009985.
- Tovar, J., Wilkinson, S., Mottram, J.C. & Fairlamb, A.H. (1998) Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in leishmania by targeted replacement of the tryA gene locus. *Molecular Microbiology*, 29, 653–660.
- Wargnies, M., Bertiaux, E., Cahoreau, E., Ziebart, N., Cruzols, A., Morand, P. et al. (2018) Gluconeogenesis is essential for trypanosome development in the tsetse fly vector. *PLoS Pathogens*, 14, e1007502.
- Zhang, W.W., Lypaczewski, P. & Matlashewski, G. (2017) Optimized CRISPR-Cas9 genome editing for *Leishmania* and its use to target a multigene family, induce chromosomal translocation, and study DNA break repair mechanisms. *mSphere*, 2, e00340-16.
- Zhang, W.W. & Matlashewski, G. (2015) CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *MBio*, 6, e00861.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Asencio, C., Hervé, P., Morand, P., Oliveres, Q., Morel, C.A., Prouzet-Mauleon, V. et al. (2024) *Streptococcus pyogenes* Cas9 ribonucleoprotein delivery for efficient, rapid and marker-free gene editing in *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Molecular Microbiology*, 121, 1079–1094. Available from: <https://doi.org/10.1111/mmi.15256>