

CIRAD-EMVT
Campus de Baillarguet
B.P. 5035
34032 MONTPELLIER Cedex 1

BA_TH 379
DK 10936
Ecole Nationale Vétérinaire
d'Alfort
7, avenue du Général de Gaulle
94704 MAISONS-ALFORT Cedex

Institut National Agronomique
Paris-Grignon
16, rue Claude Bernard
75005 PARIS

Muséum National d'Histoire Naturelle
57, rue Cuvier
75005 PARIS

**DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES**

MEMOIRE DE STAGE

CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT D'UN VACCIN
CONTRE LA TRYPANOSOMOSE ANIMALE

par

Laurence MICOUT

Année universitaire 1998-1999

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet



* 0 0 0 0 0 1 5 9 4 *

DIPLOME D'ETUDES SUPERIEURES SPECIALISEES
PRODUCTIONS ANIMALES EN REGIONS CHAUDES

CONTRIBUTION A LA MISE AU POINT D'UN VACCIN
CONTRE LA TRYPANOSOMOSE ANIMALE

par

Laurence MICOUT

Lieu de stage : NAIROBI (Kenya)

Organisme d'accueil : ILRI

Période de stage : juin - septembre 1999

Rapport présenté oralement le : 29 novembre 1999

Contribution à la mise au point d'un vaccin contre la trypanosomose animale

Vers un vaccin anti-maladie !

Sommaire

Résumé et mots clés

Remerciements

Introduction

1. Les hypothèses de travail : un vaccin anti-maladie, une protéine immunogène

- 1.1 Le trypanosome, un hémoparasite capable de déjouer les mécanismes de défenses immunitaires de ses hôtes
- 1.2 La congopaine : une protéine complexe sécrétée par le parasite avec des effets pathogènes
- 1.3 Les précédents travaux en relation avec la congopaine effectués à l'ILRI : résultats et mise en place de nouveaux projets

2. Les techniques de laboratoires utilisées

- 2.1 De l'obtention de la C2...
- 2.2 ...à la préparation des doses immunisantes
- 2.3 Le suivi de la réponse immunitaire des animaux en pré et post infection

3. L'expérience par elle-même

- 3.1 La phase d'immunisation des animaux
- 3.2 La phase post infection

Conclusion

Bibliographie

Annexes

Résumé

La prévalence de la trypanosomose bovine en Afrique tropicale et équatoriale constitue un frein majeur à la production animale dans ces régions. Les trypanosomes ont développé des systèmes complexes d'échappement aux défenses immunitaires de leurs hôtes. A cause de cela, il est difficilement envisageable de concevoir un vaccin selon les conceptions vaccinales classiques basées sur la prévention de l'infection. A l'ILRI-Kenya, des chercheurs tentent de mettre au point des moyens efficaces pour lutter contre cette maladie en s'efforçant d'élucider les mécanismes de la trypanotolérance.

Les bovins de race N'Dama, des taurins trypanotolérants, présentent une forte réponse immunitaires vis à vis d'une cystéine protéase de *Trypanosoma congolense*, appelée congopaïne, ce qui n'est pas le cas des bovins de race Boran, des zébus trypanosensibles. Les immunoglobulines G de bovins N'Dama infectés sont capables d'inhiber l'activité de la congopaïne *in vitro*. Il a alors été envisagé que cette inhibition pouvait être à la base d'un des mécanismes de la trypanotolérance. Avec cette hypothèse, on peut espérer obtenir un certain degré de tolérance à la trypanosomose en induisant chez les animaux sensibles une réponse immune adéquate contre la congopaïne.

Deux antigènes recombinants, nommés C1 et C2, issus de deux familles de cystéine protéase ont déjà été produits et testés sur des zébus Boran lors d'expériences d'immunisation infection. Dans les deux cas mais de façon plus marquée pour C2, il a été montré que les individus vaccinés avec de la congopaïne développaient certains caractères de trypanotolérance. Cependant, le trop petit nombre d'animaux impliqués dans ces travaux ont rendu des analyses statistiques difficiles. Il est prévu de les renouveler sur une plus grande échelle.

De récentes analyses ont montré que l'enzyme C2 existe sous deux formes, une de 28 KD abondante mais peu reconnue par le sérum de bovins N'Dama infectés, et une de 35 KD, peut être une forme glycosilée, très réactive avec ce même sérum mais moins abondante et plus difficile à purifier. De plus une troisième cystéine protéase appelée C3 a été clonée et synthétisée. De structure voisine à celle de C2, elle est plus facile à produire.

Il a alors été décidé d'immuniser trois zébus, chacun avec un de ces antigènes différents, et de les soumettre à une infection expérimentale à *Trypanosoma congolense*, ceci dans le but de choisir la protéine la plus adéquate pour l'expérience impliquant de nombreux animaux.

Ces travaux requièrent la mise en œuvre de plusieurs techniques de laboratoire. La production d'antigènes nécessite la fabrication des trois recombinants par des systèmes à baculovirus, leur purification par chromatographie et électroélution, pour finalement les contrôler par des techniques de SDS-PAGE, western blot, ELISA et zymogramme. L'adjonction d'un adjuvant termine la constitution des doses immunisantes. Le suivi de l'infection implique la purification de trypanosomes et de congopaïne native par chromatographie et électrophorèse. Des prises de sang avec surveillance des normes sanguines sont prévues. Le suivi de la réponse immunitaire est essentiellement effectué par des tests ELISA.

En phase de pré-infection, la fraction de 35 KD a montré un meilleur potentiel immunisant, elle a donc été choisie pour la suite des travaux et injectée en plusieurs rappels à douze bovins de race Boran. Leur réponse humorale ainsi que leur comportement face à une infection expérimentale à *Trypanosoma congolense* est en cours d'étude. L'an prochain, des résultats devraient permettre de conclure sur l'intérêt des cystéines protéases dans une approche immunologique du contrôle des trypanosomoses animales.

Mots clés : Trypanosomose, Trypanotolérance, Cystéine protéase, Congopaïne, Immunisation, Vaccin, bovin N'Dama, zébu Boran

Je tiens à remercier tout particulièrement :



- *l'équipe de l'ILRI à Nairobi et particulièrement le labo 4 pour son accueil et son aide pendant ce stage,*



- *le service enseignement formation du CIRAD-EMVT qui a su allier travail et bonne humeur durant toute cette année,*



- *ma famille, mes amis qui m'ont soutenue dans ce projet jusqu'à son terme.*

Introduction

Sur le continent africain, les ruminants, et plus particulièrement les bovins, jouent un rôle majeur, économiquement et socialement parlant, pour les populations. Pourtant un tiers de l'Afrique parmi les zones potentiellement les plus productives est infesté par les mouches tsé-tsé, vecteurs de la trypanosomose chez l'homme et l'animal.

La trypanosomose bovine constitue un frein majeur à la production animale dans la plupart des pays d'Afrique tropicale. Les symptômes de cette maladie sont représentés par de l'anémie chronique, des pertes de poids, des problèmes de reproduction, et une sensibilité accrue envers des pathologies diverses, en relation avec une immunosuppression. Principalement deux espèces de trypanosomes sont pathogènes pour le bétail, *Trypanosoma congolense* très présent en Afrique de l'Est et s'étendant progressivement vers l'ouest et le sud, et *Trypanosoma vivax*, plus commun en Afrique de l'Ouest.

Actuellement aucune méthode de contrôle de cette maladie n'est complètement satisfaisante, que ce soit au niveau de la limitation des vecteurs, ou de la prévention de la maladie. De plus de nombreux phénomènes de résistance aux divers médicaments disponibles, les trypanocides, apparaissent. Le développement de vaccin conventionnel est entravé par le phénomène de variation antigénique, la capacité du trypanosome à modifier cycliquement ses protéines de surface, échappant ainsi à la réponse immunitaire de son hôte.

Cependant il est aujourd'hui envisagé, pour la trypanosomose comme pour d'autres maladies parasitaires, que le parasite lui-même n'est pas directement responsable de la pathogénie, les symptômes étant plutôt reliés à la libération de toxines parasitaires dans l'organisme de l'hôte. En conséquence, si ces toxines peuvent être inhibées, l'état général du malade pourrait s'améliorer sans coïncider nécessairement avec une élimination du parasite. Une des façons de neutraliser ces facteurs pathologiques pourrait se faire par immunisation, d'où l'apparition du concept d'un vaccin anti-maladie par opposition à un vaccin anti-parasite.

Au cours de travaux effectués à l'ILRI-Kenya, des chercheurs du CIRAD ont mis en évidence le rôle possible de certaines protéases parasitaires dans la pathologie de la trypanosomose à *Trypanosoma congolense*. Ils se sont aussi intéressés à l'étude des mécanismes de la trypanotolérance, capacité de certaines races bovines africaines à résister à la maladie. L'observation selon laquelle ces bovins dits « trypanotolérants » développent des anticorps capables de neutraliser l'activité d'une protéase à cystéine a conduit à désigner ce type d'enzymes comme de possibles candidats vaccinaux.

De nombreux travaux ont alors été mis en place pour vérifier cette hypothèse. Des expériences sur un petit nombre d'animaux ont déjà eu lieu avec des résultats encourageants. Les efforts actuels, comme les travaux auxquels j'ai participé durant ce stage, visent à confirmer ces résultats sur des effectifs plus importants, voir à les améliorer si cela est possible.

1. Les hypothèses de travail : un vaccin anti-maladie, une protéine immunogène

1.1. Le trypanosome, un hémoparasite capable de déjouer les mécanismes de défenses immunitaires de ses hôtes

Les trypanosomoses des mammifères sont des maladies parasitaires dues à des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*. Ce sont des parasites du sang, dont la transmission à l'hôte définitif est réalisée en général par un insecte hématophage. Les trypanosomes sont caractérisés par une grande diversité génétique, qui affecte l'infectivité, la virulence, la pathogénicité, la transmissibilité, et la sensibilité aux produits trypanocides [9]. En Afrique l'hôte intermédiaire est représenté essentiellement par la mouche tsé-tsé (*Glossina* spp), vecteur biologique chez lequel le parasite accomplit une évolution plus ou moins complexe avant d'être retransmis à un mammifère.

Les ruminants domestiques africains sont principalement infectés par trois espèces de trypanosomes pathogènes : *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma vivax* et *Trypanosoma brucei brucei*. De par sa fréquence, sa pathogénicité et ses conséquences sur la productivité, *Trypanosoma congolense* est l'agent principal de la trypanosomose bovine [24]. Il est donc au centre des projets de recherche et de ce qui va suivre.

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des kinétoplastidés. *Trypanosoma congolense*, lui, fait parti du sous-genre *Nannomonas*. La variabilité génétique au sein de ce sous-genre est extrêmement importante. Observé à l'état frais, ce trypanosome semble frétiller sur place et ne traverse pas le champ du microscope comme par exemple *T. vivax*. Son mode de propulsion est de type tractelle, le flagelle émergeant du protozoaire par son avant. A aucun stade de son cycle il ne possède de flagelle libre, une membrane ondulante court tout le long de son corps. Ils ont une forte tendance à l'agglutination, et ils adhèrent aussi bien les uns aux autres qu'aux tissus de l'hôte, *in vivo*. *T. congolense* est l'un des plus petits trypanosomes, avec une longueur moyenne de 12 à 17 microns, et a la forme d'une virgule. L'extrémité de son corps est généralement arrondie, parfois légèrement pointue [24]. Son kinétoplaste, de taille moyenne, est en position marginale sub-terminale, près de la poche flagellaire. Il se prolonge en une mitochondrie géante.

Chez la glossine, *T. congolense* accomplit un cycle biologique complexe, avec évolution et multiplication. Le parasite subit une dédifférenciation et se transforme dans l'intestin de l'insecte en formes procycliques non-infectieuses. Dans les pièces buccales, les trypanosomes se transforment en formes épimastigotes, adhérentes, qui se multiplient activement. Au terme de ce cycle, leurs différenciations conduisent au stade infectieux représenté par les formes métacycliques qui ne se divisent plus. Ces formes seront ensuite inoculées à l'animal à l'occasion d'un repas de sang de la glossine. La durée totale du cycle chez l'insecte est d'environ 18 jours pour *T. congolense*.

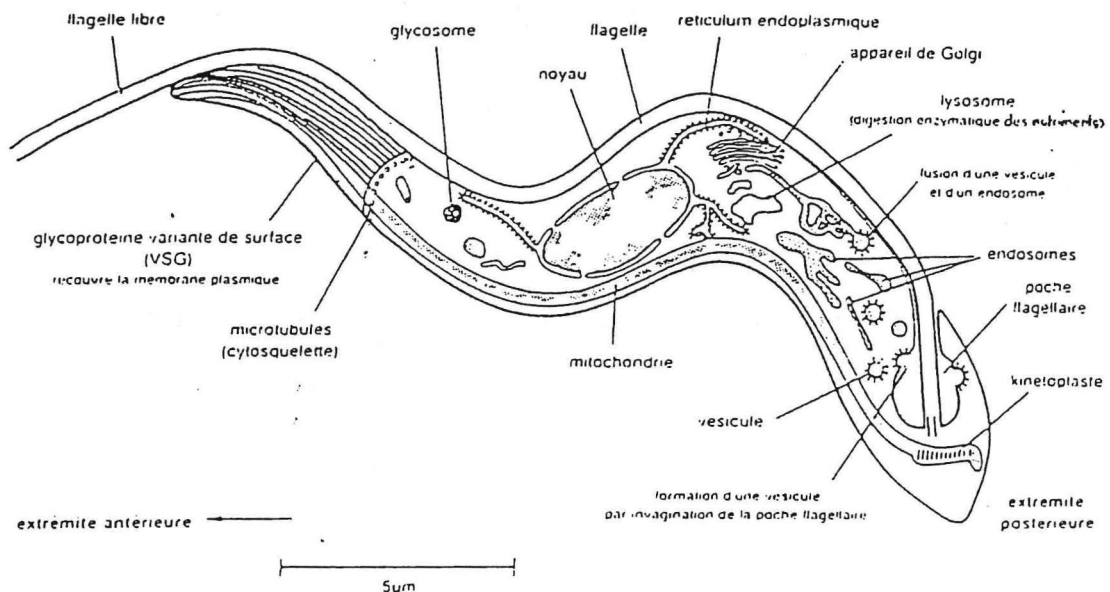
Classification des Trypanosomatidae et particulièrement du genre *Trypanosoma*

SOUS-REGNE	Protozoa	
PHYLUM	Sarcomastigophora	
SOUS-PHYLUM	Mastigophora	
CLASSE	Zoomastigophorea	
ORDRE	Kinetoplastida	
SOUS-ORDRE	Trypanosomatina	
FAMILLE	Trypanosomatidae	
GENRE	Trypanosoma	
SOUS-GENRE ; ESPECE	Tejeraia	<i>T. rangeli</i>
	Duttonella	<i>T. vivax</i>
		<i>T. uniforme</i>
	Nannomonas	<i>T. congolense</i>
		<i>T. simiae</i>
	Pycnomonas	<i>T. suis</i>
	Trypanozoon	<i>T. equiperdum</i>
		<i>T. evansi</i>
		<i>T. brucei</i>
SOUS-ESPECE		<i>T. b. brucei</i>
		<i>T. b. rhodesiense</i>
		<i>T. b. gambiense</i>

(d'après OMS, La trypanosomiase africaine: épidémiologie et lutte. Séries de rapports techniques, n°739, 1986).

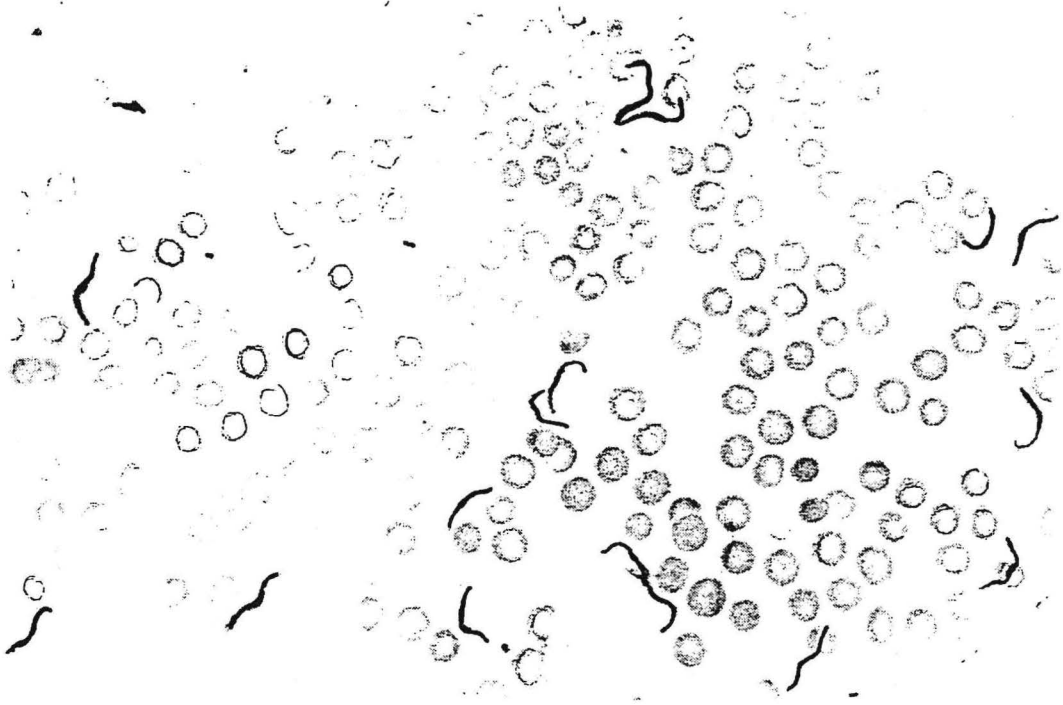
Schéma de l'organisation cellulaire du trypanosome

(d'après Vickerman 1969)



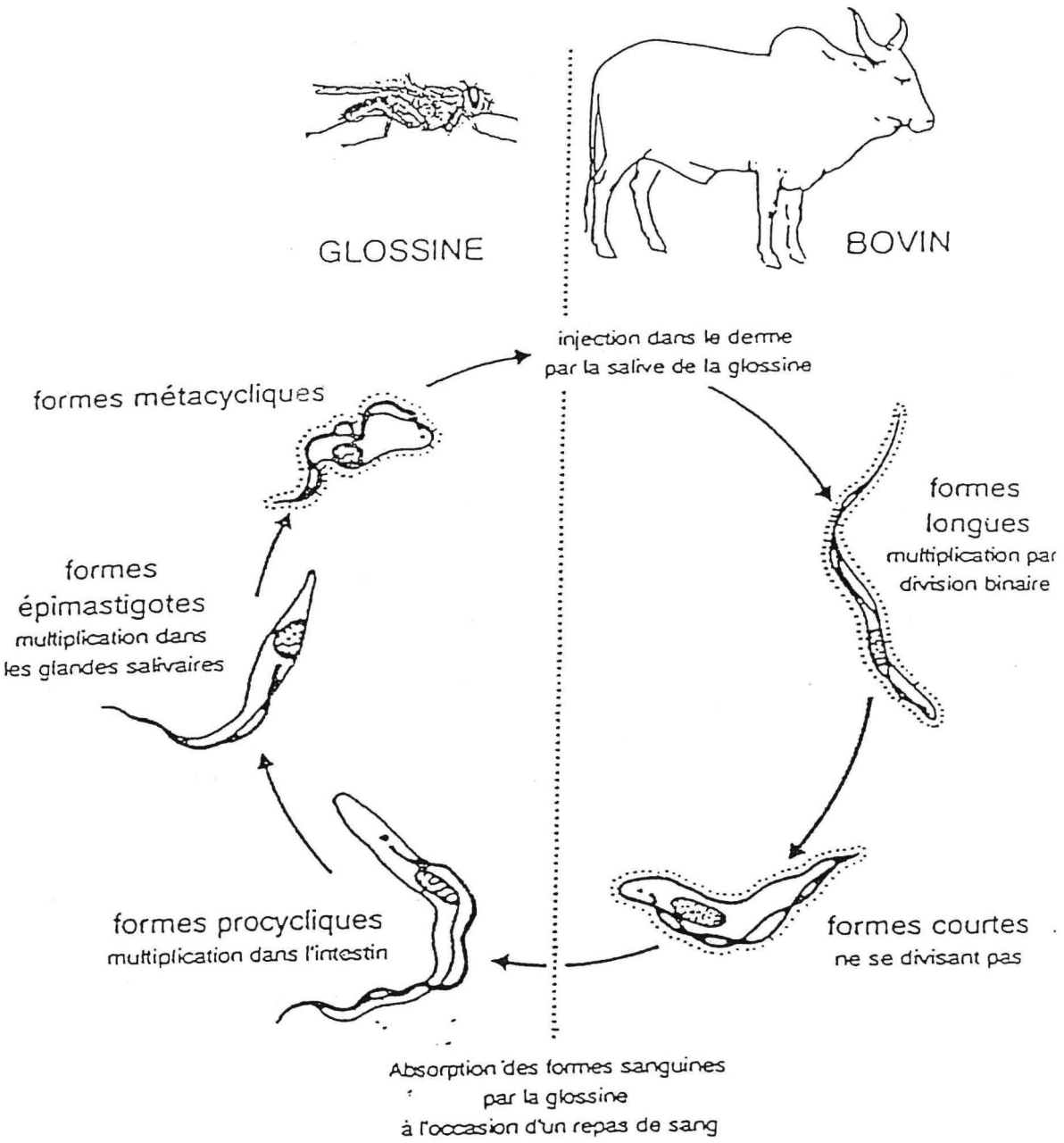
***Trypanosoma congolense* vu sur un frottis sanguin de bovin**
(G x 250)

(d'après Mramba NYINDO, 1992)



La trypanosomose bovine : le cycle parasitaire

(D'après E. Authié, 1993)



en pointillé: VSG

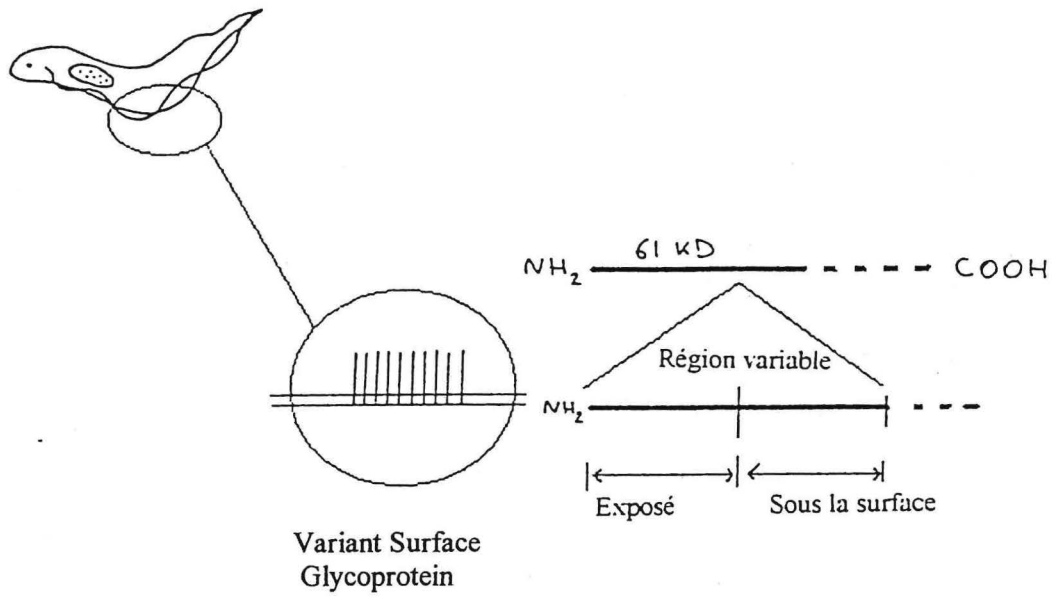
L'ingestion de formes sanguines par une glossine ne conduit pas toujours à la production de formes infectieuses du fait de mécanismes de défense de l'insecte. L'efficacité de la transmission du parasite dépend du taux d'infection des glossines et des interactions hôte-vecteurs. Dans la nature, le taux d'infection des tsé-tsé dépasse rarement les 15 % [9]. Chez le mammifère, après la piqûre infectante, les métacycliques se multiplient au point d'injection en déterminant parfois une réaction inflammatoire appelée chancre d'inoculation. De là, les trypanosomes migrent par voie lymphatique vers le ganglion de drainage. Ils sont alors détectables dans la lymphe efférente de ce ganglion quelques jours avant leur détection dans le sang. La durée de la période prépatente, de l'inoculation à la détection du parasite dans le sang, varie de une à trois semaines, en fonction de la souche de trypanosome en cause, du nombre de trypanosomes injectés, et de l'état immunitaire de l'hôte. La glossine s'infecte en se nourrissant sur un animal parasitémique, mammifère domestique ou sauvage, et une fois infectée, elle reste infectieuse durant toute sa vie. Les interactions hôtes-vecteurs conditionnent la fréquence des piqûres. Elles dépendent des habitudes nutritionnelles des glossines, qui ont souvent une préférence pour les suidés et les bovidés, et des parcours effectués par les hôtes. La saison, en influant à la fois sur les déplacements des hôtes et la distribution des glossines, joue aussi un rôle important sur les possibilités de contact.

Au cours de l'évolution, les parasites ont adopté divers mécanismes pour échapper à la réponse immune de l'hôte [23]. Pour se défendre contre les agressions, les trypanosomes ont adopté une stratégie de confrontation. L'infection est caractérisée par une succession de populations cellulaires croissantes puis décroissantes, avec des poussées tous les 7 à 10 jours. Les populations successives diffèrent par leurs antigènes de surface : cela constitue le phénomène de variation antigénique. La microscopie électronique montre que le corps cellulaire des formes sanguines et métacycliques des parasites est recouvert en totalité par un manteau antigénique très dense de 12 à 15 nm d'épaisseur. Ce manteau, constitué presque exclusivement d'une glycoprotéine, appelée VSG (Variant Surface Glycoprotéin), représente l'antigène majeur dans la protection immunologique contre les trypanosomes. Approximativement dix millions de molécules glycoprotéiques, chacune d'un poids moléculaire d'environ 60 000 daltons recouvrent le protozoaire [25]. Ces VSG, qui contiennent 7 à 17 % d'hydrate de carbone, sont reliées à la membrane plasmique par des liaisons covalentes solides. Elles forment une barrière physique entre le parasite et l'hôte. La structure en trois dimensions montrerait que seule une petite partie de la protéine est exposée à la surface du parasite, la portion amine terminale [9]. Les deux tiers de cette portion N-terminal sont très variés, contrairement au tiers de la zone C-terminal, qui, enchâssé dans la membrane cytoplasmique, représente la zone constante. Le rôle de ce manteau pourrait donc être en partie de masquer les antigènes membranaires non variables du trypanosome en présentant des motifs immunodominants aux défenses immunitaires de l'hôte. Celui-ci produit alors des anticorps dirigés contre cette glycoprotéine [48]. Ce manteau protégerait aussi les formes sanguines de la lyse par activation de la voie alterne du complément.

Dans le sang du mammifère, les trypanosomes peuvent, grâce au phénomène de variation antigénique, modifier constamment cette glycoprotéine de surface. Le temps que le système immunitaire de l'hôte produise des anticorps contre les

Aspect topologique de la glycoprotéine de surface des trypanosomes

(d'après Mansfield, 1990)



premiers antigènes rencontrés, de nouveaux variants sont apparus qui échappent à la lyse. En conséquence, la parasitémie de l'animal infecté est constituée de successions de vagues ou de pics, séparées par des rémissions où la détection du parasite est difficile. Cette variation antigénique est phénotypique, c'est à dire que le génome est stable mais différents antigènes sont exprimés les uns à la suite des autres, entraînant des modifications permanentes, suivant un ordre plus ou moins préétabli, de la structure protéique des VSG. Tous les trypanosomes ne suivent pas la même séquence pour ces variations, d'où leur séparation en différents sérodèmes (parasites exprimant les mêmes gènes). Les mécanismes impliqués sont des plus complexes et encore que partiellement connus. Un millier de gènes coderaient la structure des VSG, la variation antigénique serait due à l'expression d'un nouveau gène codant pour une VSG antigéniquement différente de celle exprimée jusqu'alors.

Outre les traitements chimiques curatifs ou prophylactiques, l'immunisation des hôtes contre les parasites est un des moyens les plus élégants de contrôler les parasitoses. Dans le cas des trypanosomes ces principes se heurtent à des difficultés inhérentes à leur biologie. Pourtant la glycoprotéine de surface est la cible principale de l'immunité humorale, et les anticorps dirigés contre les épitopes exposés de la VSG sont protecteurs. On a pu immuniser des mammifères contre *T. congolense* par la méthode d'infection suivie d'un traitement curatif, mais la protection obtenue n'est que très partielle (problèmes de ré-inoculation hétérologue, ou d'infestation massive, rôle de l'état physiologique et d'entretien de l'animal). Le potentiel vaccinal des formes métacycliques, dont le répertoire est restreint, a suscité des espoirs, mais l'immunité conférée par les métacycliques reste spécifique des sérodèmes [62]. De plus, la composition antigénique des populations métacycliques subit des modifications progressives avec le temps, et les échanges génétiques pouvant survenir chez la glossine à l'occasion d'infections mixtes accroissent encore la diversité phénotypique du parasite.

En Afrique, les perspectives de vaccination contre les trypanosomoses ont longtemps été délaissées, considérant la très grande variabilité de leurs antigènes de surface, la multiplicité des souches et la rapidité de leur circulation, sans oublier la variété des espèces présentes et l'éventuelle recombinaison des gènes au sein d'une espèce. Il est difficilement concevable de mettre au point des vaccins possédant de telles multivalences.

1.2. La congopaïne : une protéine complexe secrétée par le parasite avec des effets pathogènes

Face à la difficulté d'appliquer à la trypanosomose les stratégies vaccinales classiques, les travaux actuels s'orientent vers l'identification d'antigènes autres que la VSG, dits antigènes invariants, mais accessibles à des anticorps spécifiques sur les trypanosomes vivants. Des composants du parasite autres que la VSG induisent naturellement une réponse immune au cours d'une infection. Certains ont été identifiés comme étant des protéines du cytosquelette du protozoaire. La poche flagellaire, lieu où le manteau de glycoprotéine est très lâche et où des protéines plus ou moins spécifiques ont été détectées, représente aussi une voie de recherche possible. D'ailleurs, des fractions de la poche flagellaire de *T. brucei* ont montré un potentiel immunoprotecteur chez la souris [37,40].

Une autre catégorie d'antigènes invariants suscite un récent intérêt, non par leur localisation mais par leur implication dans les relations hôte-parasites. Comme il a été vu précédemment, les trypanosomes africains sont des parasites extracellulaires et intra vasculaires qui libèrent leurs composants (protéines de structure ou molécules impliquées dans le métabolisme du parasite) dans le plasma de l'hôte de leur vivant ou à l'occasion de chaque accès trypanolytique. Certains ont des effets toxiques qui contribuent à déterminer les symptômes de la trypanosomose. Mais ces facteurs sont aussi des antigènes invariants amenés à interagir de façon répétée avec le système immunitaire du malade. La réponse immune vis-à-vis de tels antigènes pourrait contribuer à la protection des animaux, grâce à des anticorps spécifiques bloquant l'activité de ces toxines. Cela représente une autre voie de recherche pour immuniser les animaux. Un nouveau concept est apparu : celui de vaccin « anti-toxine » ou « anti-maladie » par opposition aux vaccins traditionnels « anti-agents pathogènes ». Il s'agit d'augmenter la résistance de l'hôte à la maladie, plutôt que de prévenir l'infection par le parasite. Cette idée repose sur l'hypothèse que l'inactivation de facteurs pathogènes du trypanosome, grâce à une réponse anticorps appropriée, peut moduler la pathologie associée à l'infection. En permettant aux hôtes de mieux lutter contre la maladie, on lutte indirectement contre le parasite.

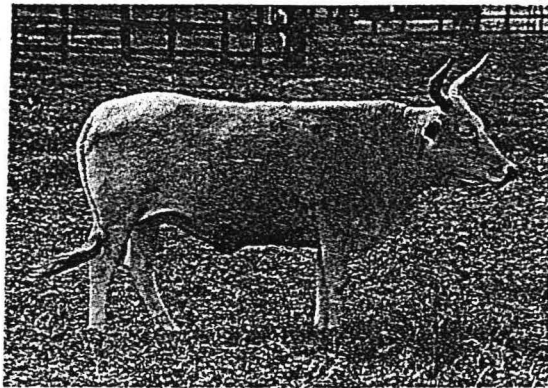
Il a été montré que les trypanosomes, une fois dans le sang de leur hôte peuvent libérer des enzymes dans le compartiment vasculaire, de leur vivant ou à la suite d'une lyse. Parmi elles, des protéases qui rentrent dans ce cadre d'antigènes invariants, et donc de potentiels candidats vaccinaux, même si leurs effets pathogènes ne sont pas encore compris [17, 39, 41, 60]. L'origine de ces travaux est basée sur l'étude comparative des réponses immunitaires à l'infection par *T. congolense* chez des bovins trypanotolérants, comme ceux des races N'Dama et Baoulé, et des bovins trypanosensibles, comme ceux de race Boran [25, 51].

La trypanotolérance est le caractère de certaines races à survivre, se développer et produire dans un milieu infesté de glossines. Cet état dépend de caractères apparemment liés mais dont le contrôle génétique serait indépendant : aptitude à contrôler la parasitémie, aptitude à contrôler l'anémie, aptitude à rester productifs malgré la maladie. Cette propriété biologique et héréditaire se trouve essentiellement, dans l'espèce bovine, chez les taurins sans bosse et de petites tailles (*Bos taurus*), alors que les zébus à bosse (*Bos indicus*) sont généralement très

Les races bovines et la trypanotolérance

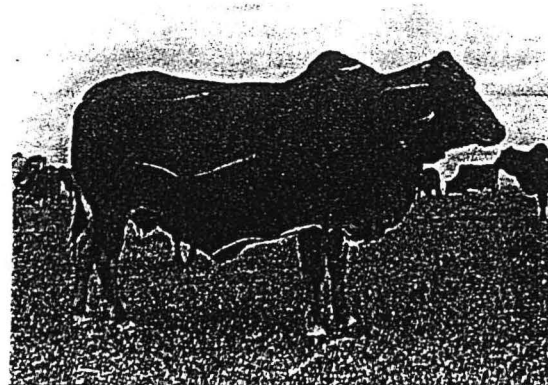
□ Bovins africains trypanotolérants :

- *Bos taurus* venus du Proche-Orient, 5 000 ans av. J-C
- Quelques races : N'Dama (« long horn »)
Baoulé (« short horn »)
Muturu
Lagune
- Exemple d'un bovin N'Dama



□ Bovins africains trypanosensibles

- *Bos indicus* arrivés en Afrique orientale avec les Arabes au cours du premier millénaire.
- Quelques races : Zébu sahélien
Zébu peul
Zébu Boran
- Exemple d'un bovin Boran



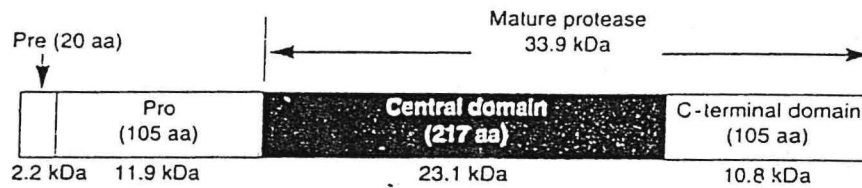
sensibles à la trypanosomose. Elle n'est cependant détectable qu'après un à deux mois d'infection, les stades initiaux de la maladie étant identiques dans les deux espèces. De plus, le degré de résistance des taurins est directement corrélé à leur état physiologique ; surmenage, malnutrition, maladies intercurrentes ou réactions vaccinales favorisent le développement de la maladie. Des études comparatives entre zébus et taurins ont été effectuées. La trypanotolérance n'est certainement pas due uniquement à des phénomènes d'immunité. Des adaptations physiologiques liées au milieu tropical jouent probablement un rôle non négligeable dans la résistance à la maladie des taurins. Par exemple, une meilleure tolérance à l'humidité, une meilleure utilisation des aliments, une thermorégulation plus efficace, une meilleure conservation de l'eau et une peau plus épaisse avec moins de piqûres d'insecte en challenge naturel, tout cela participe au phénomène de trypanotolérance. On a aussi détecté des facteurs sériques trypanolytiques chez certains individus ; le sérum du buffle et de l'élan contiendrait un facteur trypanotoxique susceptible d'agir sur les formes infectieuses du parasite dès leur pénétration dans le derme... Ces mécanismes non directement liés à la réponse immunitaire sont encore mal connus. Les observations réalisées au cours d'infections expérimentales ou en milieu naturel montrent qu'une composante non négligeable de la trypanotolérance est d'origine immunologique [9, 19].

La principale caractéristique immunologique des bovins trypanotolérants connue pour l'instant est leur capacité à produire des réponses en immunoglobulines G élevées et durables contre les antigènes des trypanosomes. Certains de ces anticorps sont dirigés contre les épitopes exposés de le VSG, responsables de l'élimination des variants successifs du parasite (et avec de meilleures réponses anamnétiques que chez les trypanosensibles), d'autres pourraient neutraliser des facteurs parasitaires impliqués dans la pathogénie, contribuant ainsi à augmenter la résistance à la maladie. De précédents travaux ont montré que des enzymes de dégradation comme les protéases sont potentiellement pathogènes, et immunogènes [6, 16]. La congopaïne, une protéase à cystéine est présente chez les formes sanguines et métacycliques de *T. congolense*, et est bien connue [6] ; elle dégrade de nombreux substrats à pH physiologique. Cette enzyme peut être mise en évidence sous forme d'antigène circulant dans le plasma des bovins parasités, et elle est très antigénique chez les individus trypanotolérants [7, 8, 54]. Les IgG spécifiques produites pendant l'infection de ces animaux ont un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique. Par contre, des niveaux très faibles d'IgG anti-congopaïne sont détectés chez les bovins trypanosensibles, du moins au cours des infections primaires. Une hypothèse est avancée pour expliquer ce phénomène : les Bovins pourraient présenter un défaut de « switch » isotypique IgM/IgG au cours de la trypanosomose (défaut lié peut être à un déficit en C3 ou à des différences au niveau des réponses cellulaires).

La congopaïne est une protéine d'environ 33 KD [6, 8, 17], localisée dans le système lysosomal du trypanosome. Elle présente une activité enzymatique semblable à celle des cathepsines L, analogue de cette protéase chez les mammifères. Récemment on a pu cloner et séquencer le gène codant pour cette protéine. La séquence d'acide aminé confirme que cette protéase appartient au groupe des papaïnes. C'est d'ailleurs en raison de ces ressemblances avec d'autres membres de la superfamille des papaïnes que cette molécule a été baptisée congopaïne.

La congopaine

Représentation schématique de la structure primaire de la cystéine protéase (congopaine) de *Trypanosoma congolense* (d'après Fish et al., 1993) aa : acide aminé.



Ces cystéines protéases sont responsables de la majeure partie de l'activité protéolytique chez les protozoaires parasites [45], et celles de *T. congolense* sont particulièrement actives. La congopaïne présente une activité enzymatique maximale à pH 6.0, mais elle reste active à des pH plus élevés, comme le pH sanguin physiologique des mammifères. Toutes les cystéines protéases des trypanosomes ont quatre domaines bien définis en commun : une séquence signal hydrophobe, une pro-région hydrophile, un domaine central contenant le site actif, et une extension C-terminal reliée au domaine central par une chaîne de proline. Cette extension C-terminal présente un faible degré de conservation ; elle n'est pas présente dans les cathepsines L.

L'expression de ces enzymes semble représenter une adaptation du trypanosome à la vie parasitaire chez le mammifère. De localisation lysosomiale, elles ont été mises en évidence au niveau de la poche flagellaire, seul lieu d'endocytose et d'exocytose du parasite. De par leur activité enzymatique, elles peuvent lyser la VSG des trypanosomes. Leur expression est régulée au cours du cycle parasitaire, avec un pic d'activité dans les formes métacycliques. Les cystéines protéases des trypanosomes pourraient être impliquées dans le « processing » intra-lysosomal et le turn-over de la VSG.

La congopaïne peut être détectée dans le plasma des animaux infectés dès le début de la parasitémie. On ne relève pas de différence significative concernant le taux de congopaïne circulant chez les N'Dama ou les Boran. Il semblerait qu'une partie de ces antigènes circulants soient une enzyme active. Les cystéines protéases des micro-organismes peuvent dégrader les protéines de leur hôte, comme celles des membranes cellulaires, le fibrinogène, l'albumine, mais aussi les immunoglobulines et les facteurs du complément. Elles peuvent aussi moduler l'activité des cytokines, directement ou pas en interagissant avec des enzymes plasmatiques. *In vitro*, une grande variété de protéines est dégradée par la congopaïne au pH physiologique. Son rôle *in vivo* est plus difficile à prouver. Plusieurs expériences ont mis en évidence une relation entre congopaïne et trypanotolérance [8]. La congopaïne est abondante dans les formes sanguines des parasites et peut être facilement suivie par chromatographie en utilisant des anticorps monoclonaux [32]. On a pu obtenir de hauts niveaux d'anticorps anti-congopaïne chez des zébus avec des infections répétées suivies de traitements trypanocides [54]. Cette réponse apparaît comme étant très spécifique de *T. congolense*, et les anticorps produits persistent longtemps après le traitement. On a pu aussi démontrer une corrélation positive entre le taux moyen d'anticorps anti-congopaïne et le degré de résistance à la trypanosomose d'une race donnée [8]. Enfin des études chez le buffle africain, *Syncerus caffer*, qui comme la plupart des espèces sauvages est particulièrement résistant à la trypanosomose, ont révélé qu'il répondait à une primo infection par *T. congolense* par un taux d'anticorps anti-congopaïne très élevé [9].

L'étude de la congopaïne semble donc très prometteuse dans le cadre de la mise au point d'une prophylaxie vaccinale contre la trypanosomose. Le but des récents travaux effectués à l'ILRI a été d'examiner les effets de cette congopaïne sur les différents composants du système immunitaire des bovins, dans le contexte des mécanismes immunosuppresseurs de la maladie d'une part, et d'évaluer l'impact de l'inhibition des anticorps induits par la protéase sur le système immunitaire d'animaux préalablement immunisés contre la congopaïne d'autre part.

1.3 Les précédents travaux en relation avec la congopaine effectués à l'ILRI : résultats et mise en place des nouveaux projets.

Les expériences de 1998-99 se sont appuyées sur un certain nombre d'observations et de travaux préalables, principalement axés sur l'étude des mécanismes de la trypanotolérance.

La plupart des études se sont appuyées sur l'étude comparée de l'évolution de la trypanosomose dans deux races bovines : la race N'Dama trypanotolérante, et la race Boran trypanosensible. Il a été démontré qu'à la suite d'infection par *T. congolense*, les réponses en IgG vis à vis des antigènes trypanosomiens dans leur ensemble sont beaucoup plus hautes chez les animaux de race N'Dama que ceux de race Boran. Cela se retrouve nettement pour l'antigène particulier que représente la cystéine protéase du trypanosome. L'importance de la congopaine dans les phénomènes de trypanotolérance étant une chose acquise, les recherches visent à affiner les connaissances de cette protéine et de ses modes d'action.

En laboratoire, il a été prouvé que les IgG des bovins de race N'Dama parasités étaient capables d'inhiber l'activité enzymatique de la congopaine *in vitro*. On a pu extraire et identifier deux cystéines protéases de *T. congolense*, enzymes au domaine recombinant central différent [6]. Ces protéines ont été mises en évidence dans des systèmes à baculovirus, système permettant d'exprimer des gènes par des cellules d'insectes, puis purifiées à partir de culture de cellules d'insecte. Cela a permis d'obtenir des antigènes en vue d'essai d'immunisation.

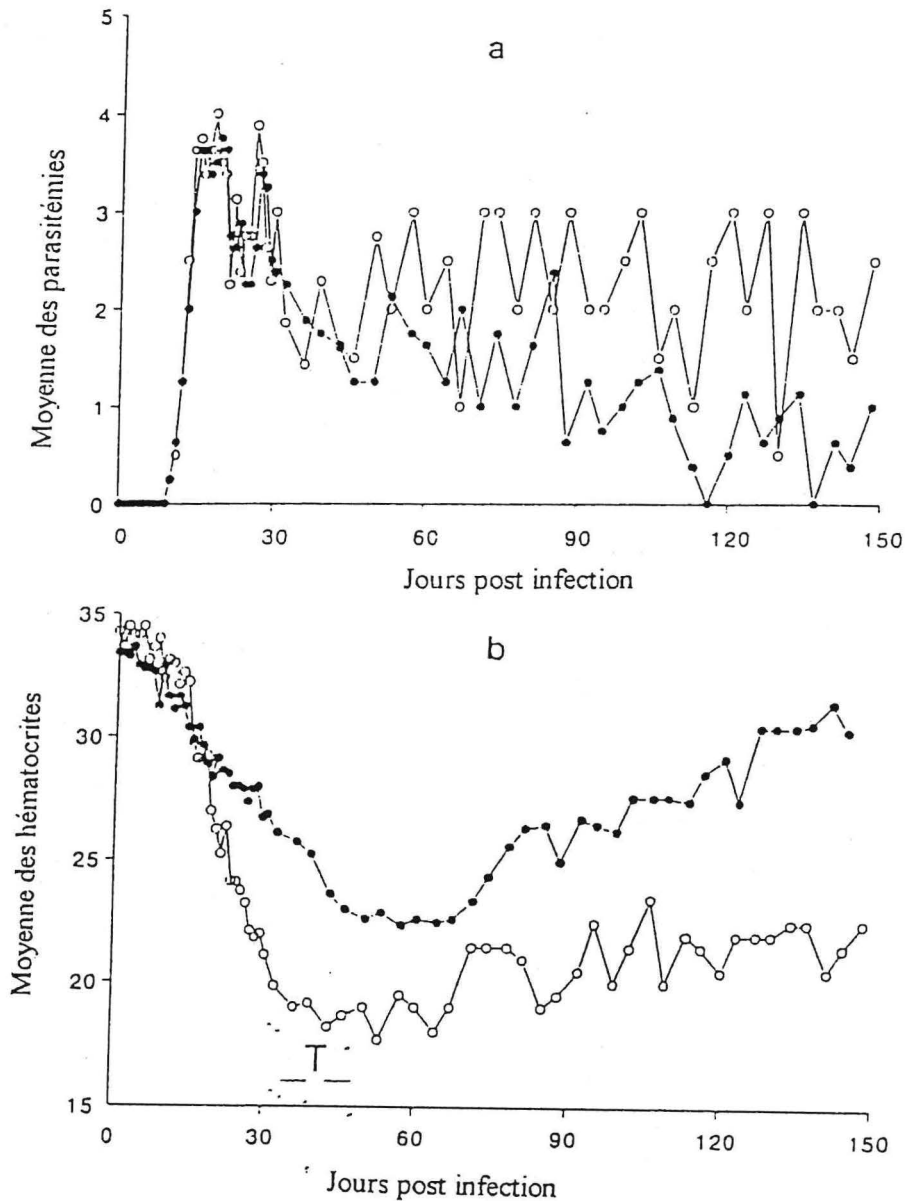
En 1997, un de ces fragments recombinants, appelé C1 a été testé sur des bovins de race Boran, suivant un protocole d'immunisation-infection. Un premier groupe d'animaux fût immunisé avec la protéase, un second groupe témoin avec de l'ovalbumine. L'autre fragment, appelé C2, a été testé de la même façon l'année suivante, seul et en combinaison avec C1.

Ces expériences se sont terminées en mars 1999, après un an d'infection, une épidémie de leptospirose (confirmée par séroconversion) peu de temps après la sortie au pré des animaux ayant entraîné l'arrêt de ces travaux. Pour l'interprétation des résultats, seules les données des huit premiers mois ont été prises en compte. Ces données concernent essentiellement l'évolution de l'hématocrite, du poids corporel, de la formule leucocytaire et de la réponse en anticorps anti-VSG pendant l'infection. Dans tous les cas, il est apparu alors que les animaux immunisés contre la congopaine avaient acquis certaines caractéristiques de la trypanotolérance. Il a été montré que chez les animaux immunisés avec la C2 (mais pratiquement pas avec la C1) les anticorps produits étaient capables d'inhiber l'activité de la congopaine naturelle. A la suite de l'infection expérimentale par *T. congolense*, tous les zébus ont développé les mêmes symptômes de la maladie pendant les quarante premiers jours suivant l'infection. La parasitémie et la chute de l'hématocrite ont subi les mêmes courbes que les animaux aient reçu un fragment de cystéine protéase ou de l'ovalbumine. Cependant le taux d'IgG contre les antigènes trypanosomiens était beaucoup plus élevé chez les individus vaccinés avec de la congopaine que chez les contrôles immunisés avec de l'ovalbumine. On a pu noter une corrélation entre le titre en anticorps anti-C2 avant l'infection et la capacité de l'individu à développer une réponse immune quelconque pendant la maladie. De la même façon chez le

Une illustration du phénomène de trypanotolérance

(d'après E. Authié, 1994)

Ces courbes représentent la cinétique de la parasitémie (a) et de l'anémie (b) chez des N'Damas trypanotolérants (rond noir) et chez des Borans trypanosensibles (rond blanc) lors d'une infection expérimentale à *Trypanosoma congolense*.



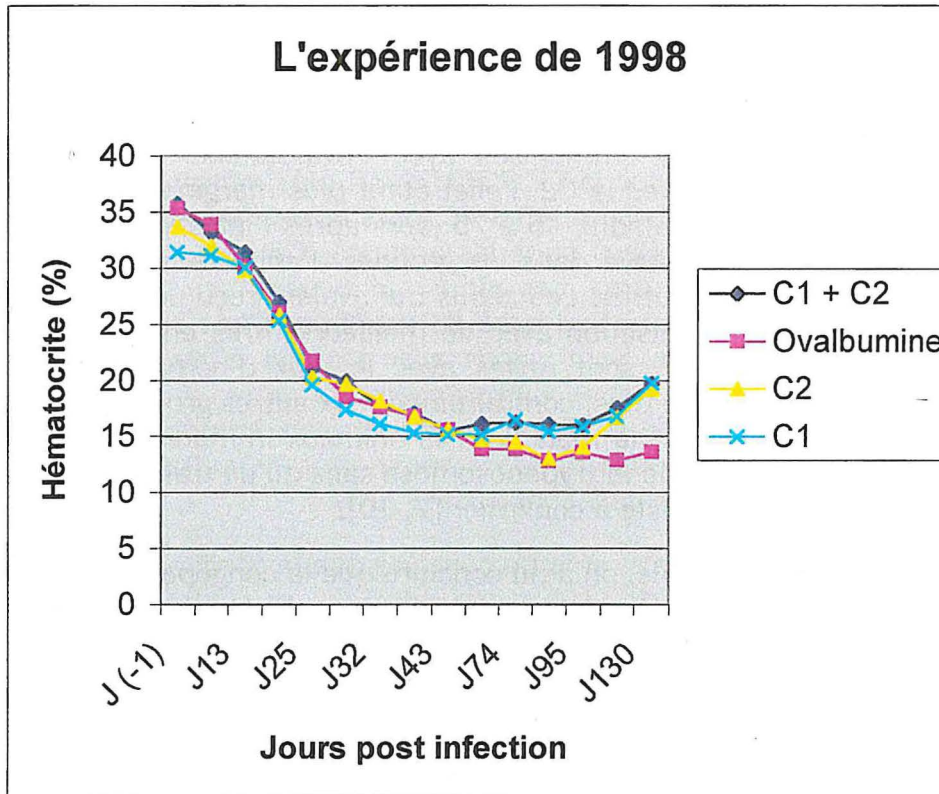
Huit bovins de chaque race ont été suivis en post infection. Six des animaux de race Boran ont dû être traités vers le 41^{ème} jour après l'inoculation du parasite, les deux autres sont restés chroniquement anémiés. Tous les N'Damas se sont négativés au niveau de leur parasitémie, et leur hématocrite a retrouvé des valeurs normales spontanément.

premier groupe d'animaux, au niveau des cellules sanguines, on a pu relever que les globules rouges étaient moins altérés, avec une macrocytose moins prononcée que chez les témoins. Cela se retrouve au niveau de la lignée blanche, avec une leucopénie et une lymphopénie moins sévère pour les zébus ayant reçu de la congopaine que pour ceux immunisés avec l'ovalbumine. Ces différences sont beaucoup plus marquées avec la C2, l'effet étant plus marginal avec la C1. Pendant la phase chronique de la maladie, 45 à 75 jours après l'infection, l'hématocrite s'est stabilisé à un niveau plus élevé dans les groupes d'animaux immunisés avec de la congopaine, que pour les autres. Les zébus qui avaient reçu un cocktail de C1 et de C2, ont répondu à l'immunisation avec de meilleurs titres en anticorps anti-C2, et durant la phase chronique, sont restés avec le taux d'hématocrite le plus élevé (supérieur ou égal à 20). De plus, contrairement aux autres groupes, ces animaux ont gagné du poids au cours de la maladie. Les animaux immunisés avec de la C2 ont semblé s'être débarrassés de la trypanosomose sans qu'un traitement quelconque ne soit nécessaire, mais cela reste à confirmer [7, 10].

A la suite de ces essais, on a pu conclure que la congopaine des trypanosomes ne protégeait pas les bovins contre une infection, ni contre la phase aiguë de la maladie. Mais, les différences biologiques entre les groupes ayant reçu C1 et/ou C2, et les groupes témoins confirment que les cystéines protéases de *T. congolense*, et particulièrement celles de la famille de C2, jouent un rôle dans la pathologie. L'immunisation avec des antigènes recombinants semble bien moduler la maladie. On suppose que la congopaine relarguée par les trypanosomes pourrait altérer le développement d'une réponse humorale spécifique chez les animaux infectés, peut être en interférant avec les mécanismes de switch isotypique. Chez les zébus immunisés, comme chez les taurins de race N'Dama, la réponse en anticorps anti-congopaine limiterait ces effets néfastes [10].

Cependant le trop petit nombre d'animaux utilisés lors de ces diverses expériences, chaque groupe n'étant constitué que de quatre animaux, rend difficile des analyses statistiques. D'où la décision de renouveler les essais d'immunisation-infection sur un nombre statistiquement significatif d'animaux, 12 immunisés et 12 contrôles, tout en améliorant aussi la technique d'immunisation.

En effet, de récentes analyses plus poussées que les précédentes sur les antigènes recombinants de congopaine ont montré que la protéine recombinante C2 existe en fait sous deux formes. L'une d'entre elles, détectée par électrophorèse et les techniques classiques de coloration des protéines, a un poids moléculaire d'environ 28 KD. Elle est très abondante mais très peu reconnue par le sérum de bovins N'Dama infectés. Son activité protéasique n'est pas des plus importantes. Par contre, une autre forme d'un poids moléculaire supérieur, de 33 à 35 KD, et qui est difficilement mise en évidence par les techniques conventionnelles, a une forte affinité avec les anticorps des taurins trypanotolérants et montre une très grande activité enzymatique. Cette dernière protéine serait peut être une forme glycosylée de C2. Enfin, une nouvelle cystéine protéase, appelée C3, a pu être extraite et clonée. Relativement voisine de C2 en terme de séquence d'acides aminés, elle s'est avérée plus facile à purifier et s'exprime de manière plus abondante dans les systèmes à baculovirus.



Ces courbes, issues des expériences de 1998, montrent bien que l'immunisation avec de la congopaine ne prévienne pas la trypanosomose. Pendant la phase aiguë de la maladie, tous les animaux, qu'ils soient vaccinés avec la cystéine protéase (C1 et/ou C2) ou avec l'ovalbumine (groupe témoin) subissent une même chute de l'hématocrite. Par contre, la différence se fait sentir en phase chronique, vers le 90^{ème} jour post infection avec l'amorce d'une remontée de ce paramètre pour les immunisés à la congopaine, contrairement aux témoins.

Lors des expériences de 1998, la préparation antigénique utilisée pour immuniser les animaux était basée sur la purification et la visualisation sur un gel de la protéine de 28 KD. Comme la protéine de 35 KD se colore peu, il est probable que la préparation finale contenait un mélange des deux formes. Puisque les bovins de race N'Dama ne reconnaissent que la protéine la plus lourde, et qu'un des objectifs de ces travaux est d'induire chez les zébus une production d'anticorps anti-congopaïnes similaire à celle des animaux trypanotolérants, il apparaît comme logique d'immuniser les Borans uniquement avec la protéine de 35 KD. Mais la séparation biochimique des deux formes de C2 n'est pas encore vraiment au point. Une alternative est possible pour résoudre ce problème. La protéine de 35 KD peut être électro-éluée à partir de gel SDS-PAGE ; il a été vérifié alors que le matériel obtenu garde son antigénicité et son activité. Bien que ce ne soit pas une procédure idéale, cela permet une production d'antigènes assez rapide, en vue de la fabrication d'un vaccin. De son côté, l'équipe du Prof. Gauthier à Tours continuera ces recherches pour développer une méthode plus satisfaisante de purification de cette protéase.

Concernant le groupe témoin, l'immunisation par l'ovalbumine n'est pas scientifiquement complètement satisfaisante car trop différente des doses immunisantes. Pour les expériences à suivre, on utilisera une protéine « neutre » exprimée dans les systèmes à baculovirus, afin de contrôler ce système de purification, de vérifier la non-contamination de la préparation à congopaïne par d'autres molécules lors de son extraction.

Enfin, il semble aussi nécessaire de tester C3 *in vivo*, cette protéase étant plus facile à obtenir. Si son activité immunisante pouvait être efficace dans le contrôle de la maladie, cela faciliterait la production du vaccin.

Dans ce cadre plusieurs travaux doivent être mis en place. La première étape est d'établir lequel des trois antigènes, de 28 KD, 35 KD et C3 est le plus adéquat, le plus actif, à injecter aux zébus. Pour cela, on a choisi d'immuniser trois animaux, chacun avec un antigène différent, et de suivre leur réponse immunitaire vis-à-vis de la congopaïne naturelle. On observera aussi l'évolution de leur état général à la suite d'une infection expérimentale par *T. congolense*. Une fois l'antigène choisi, des travaux similaires à ceux de 1997 et 1998 seront mis en œuvre, mais cette fois avec un nombre d'animaux statistiquement suffisant. Tout cela est fait dans le but de confirmer, chiffres à l'appui, qu'une immunisation du bétail trypanosensible avec un fragment recombinant de congopaïne confère un certain degré de résistance à la trypanosomose à *T. congolense*. A côté de ses expériences, d'autres recherches visant à préciser le rôle de la congopaïne dans les mécanismes d'immunosuppression sont en cours. Les objectifs sont d'examiner les effets de la cystéine protéase sur les différents éléments du système immunitaire des bovins dans le cadre de l'immunosuppression, et d'évaluer les effets des anticorps anti-congopaïne sur le système immunitaire des animaux immunisés. De nombreuses expériences *in vitro* sont envisagées.

Dans le cadre de mon stage à l'ILRI, de par ma formation vétérinaire, j'ai participé essentiellement aux expériences *in vivo*. Malheureusement, les programmes décrits ci-dessus ont pris du retard, suite à des problèmes techniques. Ce sont les aléas de la recherche. En conséquence je n'ai pas pu assister à l'ensemble de ces travaux. J'ai suivi l'immunisation des trois zébus avec les trois cystéines protéases décrites précédemment, ainsi que le début de leur réaction suite à une infection expérimentale. J'ai aussi pu collaborer à l'expérience avec les 24 taurillons de race Boran, mais seulement à ses premiers pas.

Pour tout cela, j'ai dû m'initier à certaines techniques de laboratoires, techniques qui vont être vues plus en détail maintenant.

2. Les techniques de laboratoire utilisées.

2.1 De l'obtention de la C2 ...

La C2 est une protéine recombinante synthétisée par transfert d'ADN. Au laboratoire de l'ILRI, elle est produite par des systèmes à baculovirus. C'est un système relativement lourd et compliqué dont le principe permet le transfert et l'expression de gènes étrangers dans les cellules d'insectes. Les baculovirus sont des virus d'insectes qui intègrent leur génome à celui de la cellule qu'ils infectent. Ils produisent une grande quantité d'une protéine de leur capsid. En substituant par recombinaison le gène de cette protéine virale par le gène codant pour la protéine voulue, on entraîne l'expression de ce gène étranger. Des cellules d'insectes sont utilisées pour la co-transfection avec le nouveau plasmide et l'ADN du baculovirus (recombinaison des deux molécules d'ADN par crossing over). La protéine désirée est ainsi synthétisée dans les cellules d'insectes, en relativement grande quantité, et est ensuite facilement purifiable [1]. De plus, les protéines exprimées par ce système présentent pratiquement toujours des activités biologiques semblables à celle des protéines natives. La C2 ainsi obtenue est néanmoins testée pour vérifier sa bonne corrélation antigénique avec la congopaine naturelle. On utilise pour cela la méthode ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).

La plaque ELISA est couverte avec de la congopaine naturelle qui reste adsorbée au fond des puits. On utilise ensuite du sérum de souris préalablement immunisée contre la C2. On révèle ensuite la formation des complexes antigène-anticorps par une réaction enzymatique colorée. Le résultat final est lu par absorbance, grâce à un spectrophotomètre. Cette méthode sera vue plus en détail ultérieurement.

Les préparations de C2 ainsi obtenues sont congelées rapidement à -70°C après contrôle, pour éviter toute activation ou dénaturation de l'enzyme.

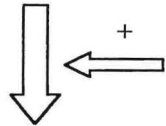
La purification de la C2 a constitué une part importante de mon travail afin de récupérer assez de matériel pour immuniser les animaux. Cela se fait par une technique de chromatographie sur colonne échangeuse d'ions. Ce procédé permet de séparer la protéine en solution des autres constituants [5].

La chromatographie est une méthode d'analyse immédiate qui permet de séparer les constituants d'un mélange par entraînement au moyen d'une phase mobile le long d'une phase stationnaire. Le principe est basé sur la migration différentielle des divers solutés contenus dans l'échantillon analysé, et obtenue par la partition des solutés entre les phases fixe et mobile. Chaque molécule du mélange à séparer est soumise à une force de rétention, affinité du soluté pour la phase fixe, et à une force de mobilité, entraînement du soluté par la phase mobile (entraînement qui dépend essentiellement de la solubilité du soluté dans la phase mobile). La résultante de ces deux forces étant variable selon la molécule, chacune migrera à une vitesse qui lui est propre. La chromatographie peut aussi permettre le dosage des

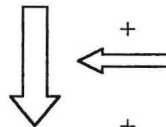
Principe du test ELISA de corrélation antigénique congopaine de synthèse- C2

La plaque ELISA est couverte avec de la congopaine naturelle qui reste adsorbée au fond des puits. On utilise ensuite du sérum de souris préalablement immunisée contre la C2. Ensuite, le principe peut être schématisé ainsi :

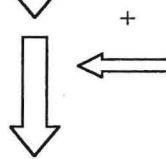
Ag-congopaine naturelle



Sérum anti-congopaine de synthèse bovia



Conjugué (anti-bovine conjugate HRP)

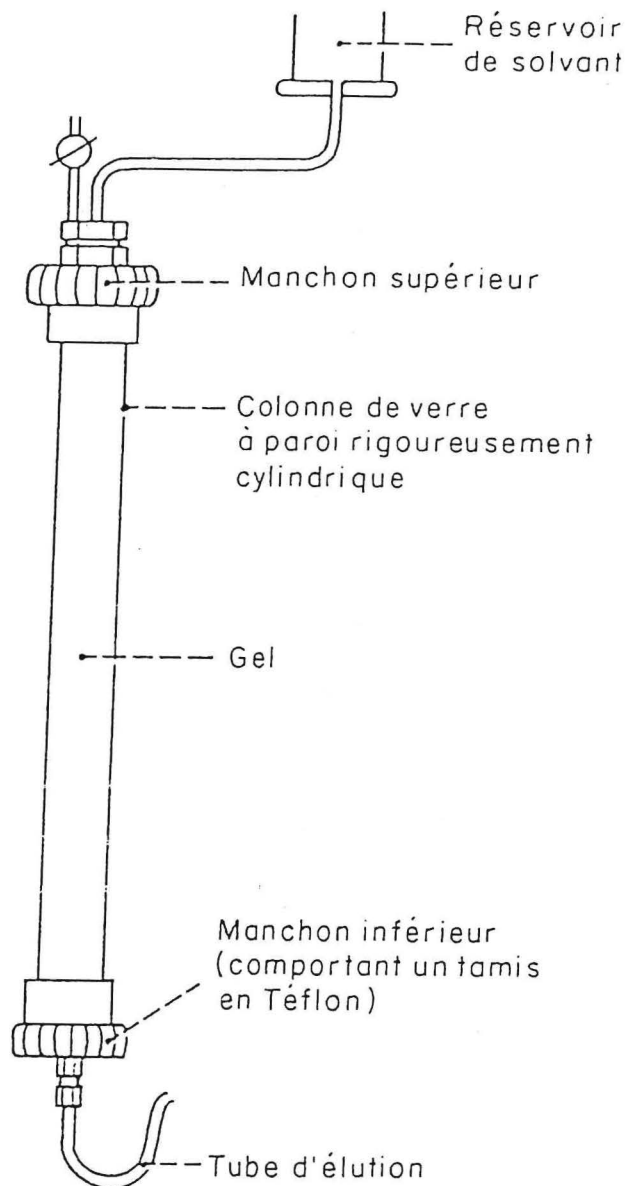


Substrat

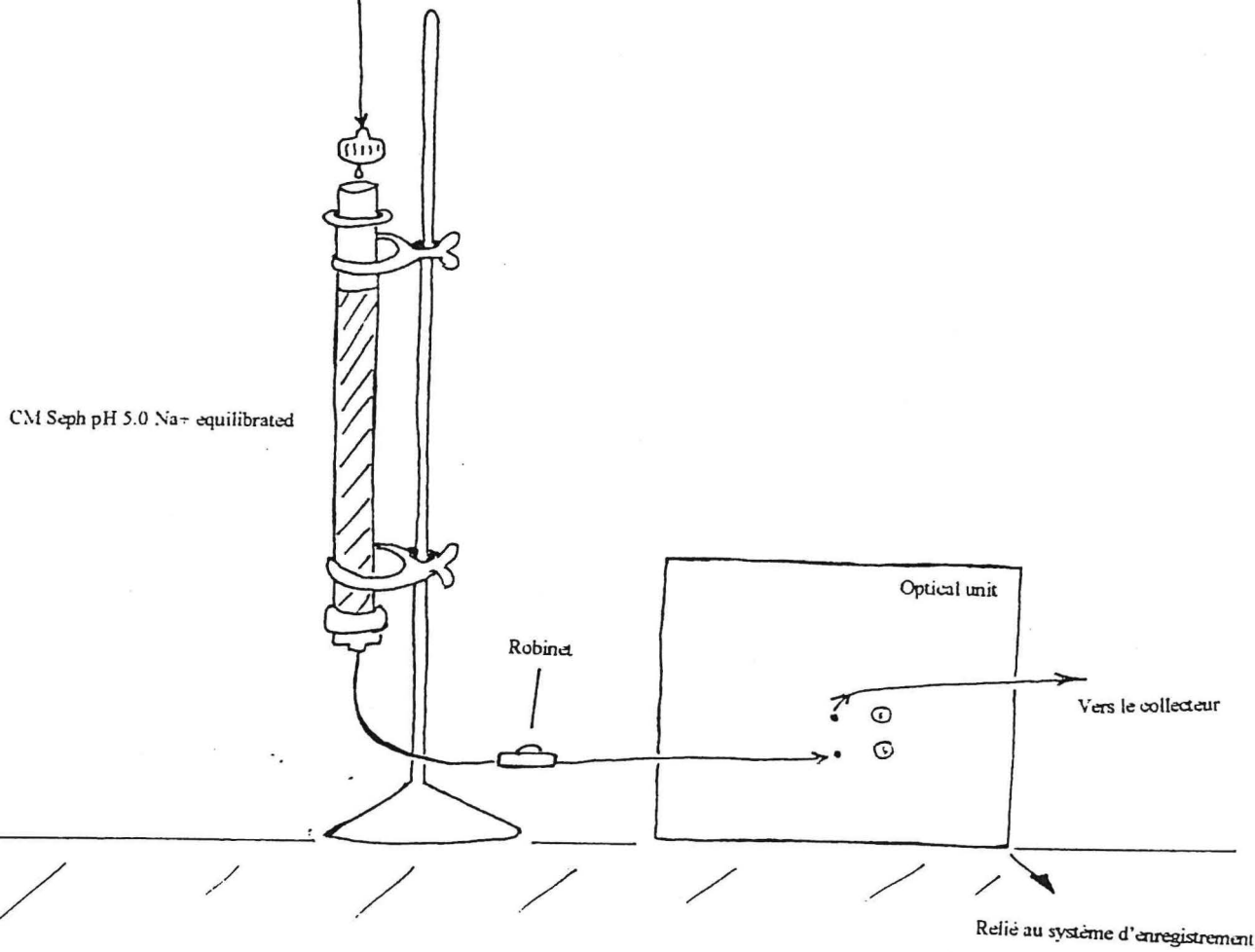
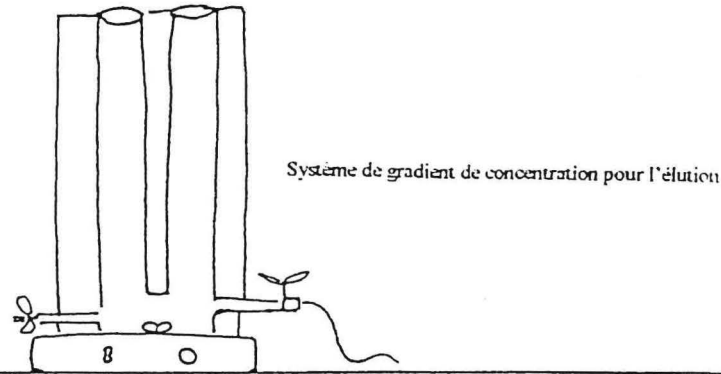
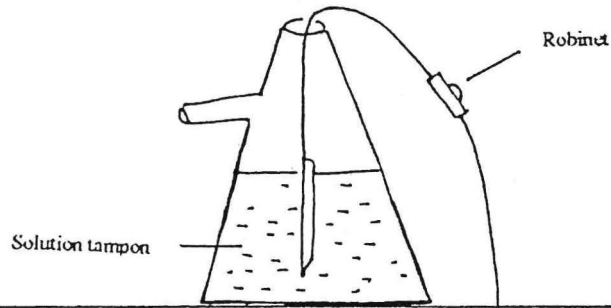
Lecture par absorbance

Schéma d'une colonne de chromatographie

(d'après Audigié et col.)



Montage pour la purification de la C2



constituants d'un soluté. Il existe différents types de chromatographie. Pour la purification de la C2, on travaille en phase liquide, ce qui signifie que la phase mobile est liquide. La phase stationnaire est un échangeur d'ions constituée par une résine porteuse de groupements ionisés. Cette macromolécule exerce des interactions de type électrostatique avec les solutés ioniques du milieu. Elle a la propriété d'échanger de façon réversible certains de leurs ions, au contact d'autres ions provenant de la solution. Cette phase stationnaire, préalablement conditionnée sous la forme ionique requise pour la séparation, est placée dans une colonne à robinet, et mise en suspension dans une solution tampon de développement. La phase liquide percole par gravité. L'échantillon à analyser est versé dans la colonne où il se fixe. De la solution tampon est ensuite rajoutée pour rincer la résine. L'élution peut alors commencer. Cela consiste à déplacer les ions fixés par d'autres, de densité, de charge, et de concentration plus élevées. Cette réaction permet la résolution du mélange, si la résine présente une affinité différente pour les ions du mélange. Cette affinité dépend de la charge des groupements fonctionnels de la résine, de la densité de charge de l'ion (fonction de sa charge et de sa taille), de la concentration des ions et de l'accessibilité des groupements fonctionnels. La vitesse des échanges est contrôlée par deux facteurs : la diffusion des ions au travers du film liquide entourant les granules de résine ; et la diffusion des ions à l'intérieur de la résine qui dépend de la porosité de cette dernière (elle varie de 5 à 3,5 nm en fonction de son taux de pontage, celui ci est choisi en fonction de l'ion recherché). Le fait d'utiliser une solution avec un gradient de concentration permet d'obtenir une élution différentielle des différents solutés. Leur analyse dans l'effluent par un détecteur de sortie de colonne permet l'enregistrement d'un graphe qui rend compte de la résolution de l'analyse [5]. En comparant ce graphe à un zymogramme, on sélectionne les tubes contenant de la C2, et on les regroupe en quatre ou cinq pools.

Ces différents pools sont ensuite concentrés. On utilise pour cela une chambre à concentration (PM 20) par pool, et on effectue des centrifugations successives d'environ 20 mn à 2000 tours/mn, à 4°C. Filtrats et concentrats sont récupérés et testés avec un zymogramme ; cela permet surtout de vérifier qu'il n'y a pas eu de fuite de la protéine au niveau des chambres. Les filtrats, en principe négatifs, sont jetés ; la congopaine concentrée est stockée dans de petits tubes labellés (date de la C2, date de sa purification, nom de la fraction ou pool, avec une fraction supplémentaire constituée par le liquide de rinçage des différentes chambres avec 500 µl de Phosphate Buffered Saline pH 7,4 ou PBS), puis congelée.

Avant toute utilisation des solutés concentrés obtenus, ceux ci sont testés par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Une première sélection des pools les plus riches en congopaine est effectuée par SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate- Polyacrylamide Gel Electrophoresis) sur Phast gel, suivi d'une coloration à l'argent.

La méthode SDS-PAGE est un important procédé analytique dans le cadre de la biochimie des protéines et de l'immunochimie [5, 35].

L'électrophorèse est une méthode d'analyse (identification et dosage) et de fractionnement, basée sur la migration différentielle de particules chargées électriquement sous l'influence de champ électrique. Ici, les particules chargées sont des protéines, donc des macromolécules portant des groupements ionisables,

Le zymogramme



Il permet de détecter une enzyme par la visualisation de son activité par fluorescence. Pour la congopaïne, vu son pH d'activation, le test se fait avec deux solutions, une à pH 4, l'autre à pH 6,2. Une réaction positive au pH le plus basique est recherchée, avec ou sans positivité associée au pH 4.

On utilise une plaque ELISA que l'on partage en deux. Chaque moitié reçoit 100 μ l par cupule d'une des deux solutions. Puis de manière symétrique pour les deux zones définies, on ajoute 20 μ l des différents tubes à tester. Après avoir agité légèrement la plaque on la lit en révélant la fluorescence sur une table en lumière ultra violette. Les tubes positifs à l'un et/ou à l'autre des pH sont repérés et servent à la constitution des pools décrits plus haut.

Composition des deux solutions utilisées (pour 50 ml) :

-pH 4 50 ml de Na acétate 500 mM pH 4,2
 200 μ l DTT 0,5 M
 50 μ l Z.Phe-Arg-NMC 50 mM
 50 μ l EDTA 500 mM

-pH 6,2 50 ml de Mes 50 mM pH6,2
 200 μ l DTT 0,5 M
 50 μ l Z.Phe-Arg-NMC 50 mM
 50 μ l EDTA 500 mM

et les charges sont dues à l'ionisation des radicaux portés par la molécule. Le déplacement de la protéine est lié à sa charge, à sa taille et sa forme principalement, sans oublier les conditions de la manipulation (viscosité du tampon par exemple) et le support (comme sa texture) qui interviennent aussi.

Le support employé dans nos expériences est le gel de polyacrylamide, une macromolécule réticulée. Ce gel est préparé extemporanément et coulé entre deux plaques de verre. C'est un copolymère d'acrylamide et de NN'-méthylène bis acrylamide qui assure le pontage entre les chaînes de polyacrylamide. En modifiant le taux de pontage, il est possible, en modifiant la réticulation, de calibrer le diamètre des pores entre 0,5 et 4 mm. Dès lors, le gel de polyacrylamide se comporte comme un tamis moléculaire, cet effet se superposant à la séparation électrophorétique. Une électrophorèse en gel de polyacrylamide est une technique couplant une séparation électrophorétique à un tamisage moléculaire. La polymérisation de l'acrylamide nécessite la présence de deux catalyseurs : le TEMED [tétraméthyl-éthylène-diamine] et le persulfate d'ammonium. La taille des pores du gel est conditionnée par deux facteurs: la proportion de molécules-pont, et la concentration totale en acrylamide (la taille diminue quand la concentration augmente) [5, 13 , 62].

Le SDS [sodium dodecyl sulfate] est un dénaturant doux et un surfactant. Une électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de cette molécule (méthode SDS-PAGE) est une méthode d'analyse séparant les protéines en fonction de leur géométrie : masse moléculaire et forme. Le SDS dénature les protéines multimériques en sous unités, et sature les protéines en charges négatives. Les protéines, alors transformées en manopolyanions, possèdent toutes la même mobilité électrophorétique. La charge négative globale permet la migration vers l'anode, mais les molécules sont séparées uniquement par effet de tamis moléculaire. Il existe une relation de linéarité entre le logarithme de la masse moléculaire et le déplacement électrophorétique. A l'aide de marqueurs protéiques (des protéines pures de masse moléculaire connue), et connaissant le poids moléculaire de la protéine étudiée, on peut repérer cette dernière sur le gel, et par-là même vérifier sa présence. Cette technique peut aussi servir à déterminer la masse moléculaire d'une protéine [5, 35].

Pour les Phast Gels, les manipulations sont réduites, simples et grandement automatisées. On utilise un appareil, un PhastSystem ; les gels sont fournis prêt à l'emploi (on utilise ici des gels à 8,25 %), ainsi que les bandelettes tampons. La barrette de capillarisation contenant les échantillons, préalablement mélangés à un tampon, et le poids moléculaire de référence, est insérée dans l'appareil. L'électrophorèse commence alors et dure environ trente minutes. Le gel est récupéré et coloré. Pour les échantillons contenant de la C2, une bande plus ou moins large apparaît au niveau du poids moléculaire 35 KD. On peut alors éliminer les pools n'en contenant pas.

Il faut ensuite affiner ces résultats et vérifier la pureté de chaque préparation et l'intégrité de la molécule de C2 avant la préparation du « vaccin ».

Technique de purification de la C2



- Le tube de C2 doit être retiré du congélateur la veille et mis sur glace en chambre froide toute la nuit (préserve toute activation enzymatique) ou, à défaut, on peut réchauffer le tube au bain-marie à 37°C mais sans parvenir à une décongélation totale.
- Une colonne de taille moyenne est remplie avec du [CM seph pH 5,0] conservé à 4°C.
- Le bas de la colonne est relié à un moniteur dont la cellule a été préalablement rincée à l'eau distillée. Un bûcher contenant une solution tampon [citrate 25 mM pH 4,5] est installé au-dessus du système, une tubulure permettant de faire couler la solution du bûcher à la colonne.
- Le niveau de la colonne doit se tasser à environ 1 cm du bouchon, il faut rajouter du produit plusieurs fois si nécessaire. La colonne ne devant pas sécher, on la rince avec la solution tampon jusqu'à ce qu'il y ait stabilisation du système.
- Pendant ce temps le collecteur est préparé avec le rangement des tubes pré-numérotés, et le réglage des paramètres (type de rack utilisé : A ; nombre de racks : 3 ou 4 ; mode : drop ; nombre de gouttes : de 50 à 65).
- La colonne étant stabilisée, il faut régler le zéro de l'enregistreur (short) puis la ligne de base. Le défilement du papier est fixé à 5 ou 10 cm/h (utilisation de petits échantillons). Il faut ensuite régler la ligne de base.
- Après centrifugation (5 mn à 1500 tours/mn), la C2 doit être activée. On ne purifie jamais plus de 10 à 12 ml de solution à la fois. L'activation de la C2 se fait en acidifiant son milieu avec 1/10^e d'acétate 500 mM. La solution doit atteindre un pH voisin de 4,3 à vérifier au pH-mètre. S'il est supérieur à 4,5, il faut rajouter de l'acide acétique (quelques micro moles !!). Une fois le degré d'acidité voulu obtenu, le tube est mis en incubation 5 mn à 37°C. Si la solution finale est trouble, elle doit être recentrifugée. Puis elle est versée peu à peu dans la colonne rincée et stabilisée. La purification commence vraiment là.
- Le gradient de concentration pour l'élution est préparé avec du côté opposé au robinet de sortie la solution la plus concentrée [50 ml de solution tampon + 5 ml de NaCl 5M, pH ajusté avec NaOH 1M tel que 4,5], de l'autre côté 60 ml de solution tampon. L'autre récipient est rempli avec 60 ml de solution tampon (10 ml de plus que pour la solution la plus concentrée pour ne pas choquer la colonne).
- Le tube de C2 est vidé progressivement dans la colonne, le système de collection et l'enregistreur ayant été mis en marche. On observe généralement un important pic sur l'enregistrement. Le tube entièrement passé, on rince la colonne avec la solution tampon jusqu'à ce que l'enregistrement revienne à la ligne de base. Alors on

commence l'élution en faisant s'écouler le gradient de concentration dans la colonne. Cela se traduit classiquement par de nouveaux pics, peu élevés, sur le papier. Quand tout est terminé, on nettoie la colonne en faisant passer une solution [2M NaCl, 100 mM Tris]. Toutes ces différentes interventions sont notées sur l'enregistrement, ainsi que les numéros des tubes du collecteur lors de variations importantes sur le papier.

- Grâce à un zymogramme qui permet de détecter l'activité de la congopaine, on teste tous les tubes récupérés dans le collecteur. On repère ainsi les tubes susceptibles de contenir l'enzyme. En comparant ces résultats avec la courbe de l'enregistrement, on détermine 4 à 5 pools de tubes, nommés suivant leur localisation sur le tracé.

Exemple de pools obtenus :

- 1- unbound (fin de résidu)
- 2- premier pic (rarement visible)
- 3- première moitié du deuxième pic
- 4- deuxième moitié du deuxième pic
- 5- traîne

- On passe alors à l'étape de concentration de ces différents pools.

Electrophorèse sur Phast gel



On utilise un gel de polyacrylamide à 8,25 % vendu prêt à l'emploi, ainsi que les bandelettes de tampon. Ce gel doit être manipulé avec des gants et de petites pinces. Il est inséré dans l'appareil Phast System sur une goutte d'eau, en le faisant glisser pour éviter les bulles d'air. Une fois en place, la feuille protectrice est retirée. Les deux bandelettes tampons sont alors insérées dans leur logement, au-dessus du gel. Le système d'électrode est rabattu sur l'ensemble, et une légère pression sur le système assure un bon contact.

Les échantillons sont préparés de la façon suivante : 3 μ l de chacun d'entre eux (au maximum 7) et d'un poids moléculaire (LMW) sont mélangés à 3 μ l de solution tampon [Tris-HCl pH 8,0, 10 % b-mercaptoethanol, 5 % SDS, 2 mM EDTA]. Des petites cupules alignées sont imprimées en relief par grattage d'un film de paraffine sur un support prévu à cet effet ; 3 μ l des préparations préalablement agitées y sont déposées. Le poids moléculaire est toujours mis à une des extrémités. Une barrette 8/1 (pour huit cupules) avec huit puits à capillarité est alors plongée verticalement dans les cupules. La quantité nécessaire de chaque préparation est ainsi prélevée, et la barrette est mise en place dans l'appareil, au niveau du premier cran. La manipulation est alors lancée et dure environ 30 mn, l'appareil s'arrêtant seul.

Le gel est alors récupéré, toujours avec des pinces, et mis à colorer 2 heures dans du bleu de Coomassie, puis trempé dans du décolorant jusqu'à obtention d'une teinte adéquate. Les bandes de migration des protéines sont ensuite accentuées par une coloration à l'argent.

Méthode de coloration à l'argent pour Phast gel

1. Laver le gel deux fois 2 mn dans une solution à 50 % éthanol et 10 % acide acétique.
2. Mettre le gel à incuber 5 mn dans une solution de glutardialdéhyde à 8,3 % (ré-utilisable).
3. Rincer le gel deux fois à l'eau distillée.
4. Mettre le gel à incuber 15 mn dans une solution d'AgNO₃ à 0.5 %.
5. Rincer le gel deux fois à l'eau distillée puis l'y faire tremper 2 mn.
6. Rincer le gel une fois dans le développeur, puis l'y incuber jusqu'à l'obtention d'une coloration suffisante. (composition du développeur : 10 ml de NaCO₃ à 12.5 %, 40 ml d'eau distillée, 200 ml du stock de formaldéhyde)
7. Arrêter le développement en ajoutant une solution d'acide acétique à 5 %.
8. Mettre le gel à tremper toute une nuit dans une solution de glycérol à 10 % et 5 % d'acide acétique pour fixer la coloration.



2.2 ... à l'obtention du vaccin

La pureté des préparations obtenues est vérifiée, toujours par électrophorèse mais cette fois sans SDS et sur des mini-gels préparés extemporanément. Pour chaque analyse, deux mini-gels sont nécessaires à chaque fois, un avec gélatine et un sans. Dans les deux cas on utilise un mélange à 12 % de polyacrylamide, et on rajoute pour l'un des deux gels 0,1 % de gélatine. On utilise des peignes à huit puits, on peut donc tester sept échantillons en même temps, le dernier puits étant réservé au marqueur de poids moléculaire. Les deux gels sont placés dans la même cuve à électrophorèse, échantillons et poids moléculaire associés à une solution tampon sont chargés dans les puits, et le système, préalablement refroidi est mis en route. L'électrophorèse est donc effectuée de manière identique pour les deux gels. Le temps de migration des protéines dans le gel est fonction de l'intensité du courant qui y circule.

Une fois que le processus est terminé, on récupère les gels qui subissent alors des traitements différents.

Le gel avec gélatine est lavé deux fois 20 mn dans une solution composée de Tris 100 mM pH 6,8, contenant 20 % de glycérol, afin de re-naturer les protéines. Il est ensuite mis à incuber trois heures à 37°C dans une solution de Mes 50 mM pH 6,2, contenant 0,5 mM de DTT et 1 mM d'EDTA, puis toute la nuit dans ce même mélange mais à température ambiante. Le lendemain, le gel est rincé à l'eau puis coloré au bleu de Coomassie comme précédemment pour le Phast gel.

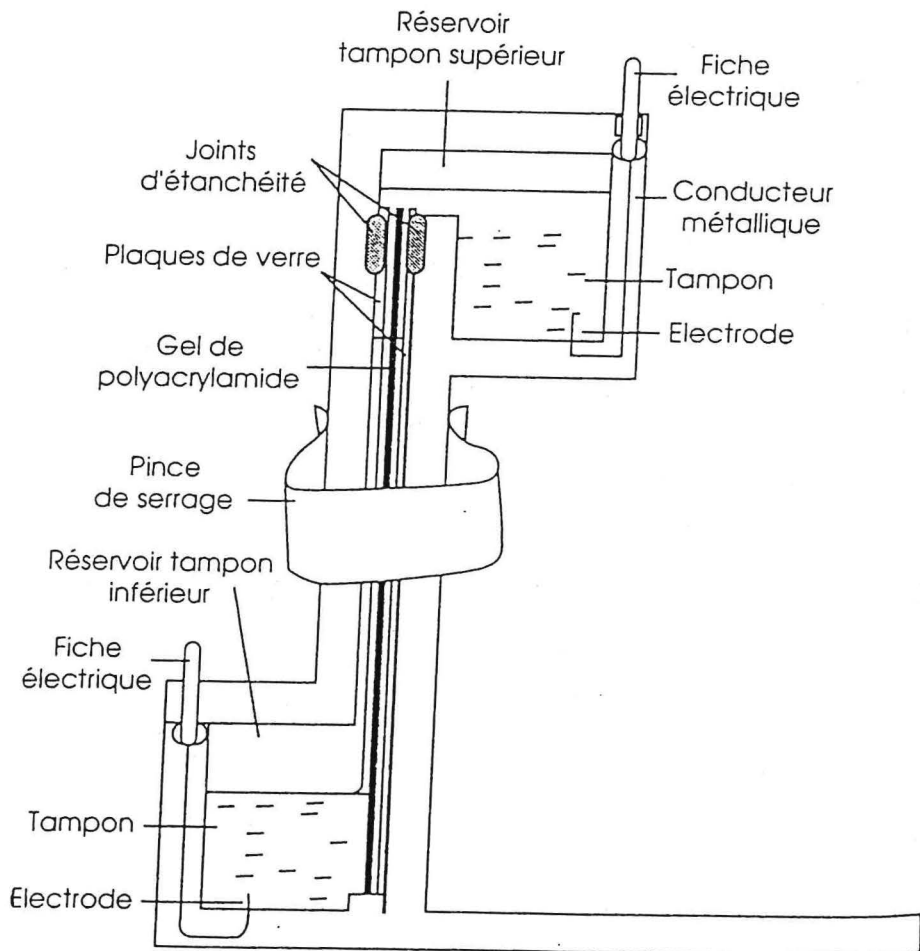
Pour le gel sans gélatine, après migration la révélation est effectuée par transfert sur un support solide : le blotting [62]. Ce transfert s'effectue, pour les protéines, sur une feuille de nitrocellulose. On utilise pour cela la méthode de l'électroblotting. Au sortir de la cuve d'électrophorèse, le gel est lavé trois fois par des bains de 10 mn dans une solution de Tris 100 mM pH 6,8 contenant 20 % de glycérol. Puis le gel est mis en sandwich avec la feuille de nitrocellulose dans un système prévu à cet effet et le tout est mis en place dans l'appareil d'électroblotting. Après trois heures à 70 V ou toute une nuit à 15 V, la feuille de nitrocellulose est récupérée et mise à sécher une demi-heure dans un four à 37°C. On réalise alors un Western-blot pour révéler les bandes de migration des protéines. Le principe est de faire agir dans un premier temps, un anticorps monoclonal sur la protéine, puis un deuxième anticorps monoclonal conjugué à une enzyme, sur le premier. On visualise ensuite les réactions par une méthode de colorimétrie enzymatique dont le substrat est du peroxyde d'hydrogène mis en présence avec du 1-chloro-4-naphtol.

En comparant tous les résultats acquis par les trois méthodes décrites ci-dessus (Phast gel, SDS-PAGE sur mini-gel et Western-blot), on sait exactement ce que contiennent les pools obtenus après la phase de purification. Les tubes où la pureté et l'intégrité de la molécule de C2 sont prouvés sont alors utilisés pour la préparation des doses immunisantes.

Il faut tout d'abord extraire la cystéine protéase de la solution résultant de la purification. C'est encore une fois possible grâce à la technique d'électrophorèse. Jusqu'à présent, seules de petites quantités de solutions étaient passées sur les gels

Vue en coupe d'une cuve d'électrophorese verticale pour gel de polyacrylamide

(d'après Audigié et coll, 1995)



lors des tests. Maintenant que l'on sait sur quoi on travaille de manière plus précise, c'est la fraction entière qui va subir une électrophorèse. On prépare cette fois un grand gel, le volume à passer étant plus important, toujours concentré à 12 % d'acrylamide, mais contenant du SDS pour une meilleure migration des protéines. Une préparation appelée stacking est aussi rajoutée au gel, après qu'il se soit solidifié. Ce mélange se gélifie aussi, et c'est dans cette zone que seront créés les puits destinés à recevoir les échantillons. Cela permet de tasser les échantillons, les protéines commenceront alors leur migration toutes en même temps. Le principe est ensuite similaire à celui des mini gels. Le poids moléculaire utilisé cette fois est du Rainbow.

Après avoir démoulé le gel, il faut y découper la bande correspondant à la C2. En principe avec le poids moléculaire qui est utilisé, les colorations sont visibles sans manipulation supplémentaire. Toutefois on peut colorer le gel au bleu de Coomassie si les bandes ont besoin d'être renforcées. La découpe se fait horizontalement, légèrement en courbe, un peu au-dessus et en dessous de la zone de poids moléculaire de 35 KD. Cette bande peut être congelée.

Pour la conception de dose immunisante de C2, il faut encore extraire la cystéine protéase du gel. Cela se fait par électro-élution, après extraction du SDS (le SDS est un produit potentiellement toxique qui ne doit pas être injecté aux animaux). Le fragment de gel de polyacrylamide préalablement découpé est placé dans une cuve d'électroélution. Le système est mis sous tension, et sous l'effet du courant électrique, il y a passage de la protéine dans la solution tampon de la cuve [5]. La solution obtenue est récupérée par pipetage. On vérifie alors une nouvelle fois la pureté de la préparation en la testant sur mini gel, surtout avec gélatine.

L'antigène ainsi contrôlé de multiples fois est alors mélangé à un adjuvant en vue d'améliorer l'immunisation résultante à son injection chez l'animal. L'adjuvant choisi ici est le Montanide ISA 206.

Les adjuvants aux vaccins de la gamme Montanide sont basés sur un concept relativement nouveau. Il est défini comme étant une composition d'eau dispersible contenant des composants organiques actifs immunologiquement (ce sont de nouvelles substances immunostimulantes) et des excipients spécifiques. Ce type d'adjuvants a été choisi pour plusieurs raisons et tout d'abord pour leur innocuité. En effet, contrairement aux excipients huileux, on relève de très rares effets secondaires consécutifs à leur injection, comme la formation de granulomes ou d'abcès stériles avec poussées fébriles. De plus ces adjuvants peuvent être utilisés avec de nombreux types d'antigènes (inactivés, atténués, recombinant,...) et la réponse immunitaire induite est forte, rapide et persiste longtemps. De plus cette réponse est à la fois cellulaire et humorale. Enfin, ces adjuvants sont faciles à utiliser car basés sur des composants solubles. Par conséquent aucun matériel spécialisé n'est nécessaire pour la fabrication du vaccin. La formulation est fluide, donc facile à injecter, et le vaccin une fois préparé peut se conserver 6 mois à 4°C.

Le Montanide ISA 206 est l'adjuvant de la gamme Montanide qui correspond le mieux à la conception du vaccin avec la C2. Il est formulé selon une méthode dite « water in oil in water », l'huile étant une huile minérale. Cette formulation diminue

MONTANIDE® IMS

An innovative range of adjuvants
for vaccines and injectables

- NEW CONCEPT : “ IMMUNOSOL ”
- GIVES SAFE IMMUNOLOGICAL PREPARATIONS
- ELICITS HUMORAL AND CELL-MEDIATED IMMUNE RESPONSES
- READY AND EASY TO USE
- RENDERS STABLE FORMULATIONS
- LEADS TO GOOD SYRINGEABILITY

LIST OF MONTANIDE ISA

EMULSION TYPE	TYPE OF OIL		
	mineral adjuvant/antigen (w/w)	non mineral adjuvant/antigen (w/w)	mixture of mineral /non mineral adjuvant/antigen (w/w)
W/O	ISA 50 (50/50) ISA 70 (70/30)	ISA 708 (70/30) ISA 763 A (70/30)	ISA 740 (70/30) ISA 773 (70/30)
W/O/W	ISA 206 (50/50)	ISA 207 (50/50) ISA 264 (50/50)	ISA 266 (50/50) ISA 267 (50/50)
O/W	ISA 25 (25/75)	ISA 27 (25/75) ISA 35 (25/75)	ISA 28 (25/75)

encore la viscosité de la préparation comparée aux formules « water in oil », ce qui facilite d'autant plus son injection. La réponse immunitaire induite par ce produit est très précoce et persiste longtemps. Ce type d'adjuvant peut être utilisé sans problème sur de nombreuses espèces, comme les bovins, ovins, poissons, porcs à l'engrais et volailles.

La préparation du vaccin se fait en deux étapes. On doit tout d'abord préparer l'adjuvant. Pour cela, il faut utiliser un système d'agitateur en Y. On prépare séparément une quantité suffisante de la phase aqueuse et de la phase huileuse de Montanide ISA 206 (mais au maximum 150 g de chaque). Si nécessaire la phase huileuse est homogénéisée avec une spatule. Les deux phases sont portées à la température de 30°C dans un bain-marie. Une quantité précise de la phase huileuse est versée dans un bêcher de 250 ml, et remuée doucement à l'aide de l'agitateur. On ajoute alors la même quantité, en poids, de la phase aqueuse et ce en approximativement 20 à 30 secondes. L'agitation est alors augmentée jusqu'à 50 % du maximum possible et ce pendant 10 mn. Alors l'adjuvant est prêt et peut être mélangé à l'antigène. Ce dernier est dosé différemment selon l'espèce qui doit être vaccinée : 50 µg de congopaine pour un lapin, 20 µg pour une souris, et 100 à 200 µg pour un bovin. L'antigène est mis en solution dans du PBS pour obtenir un volume final de 0,5 ml à 1 ml suivant les cas. Pour l'ISA 206, la proportion finale du mélange solution antigénique-adjuvant doit être de 50/50. La préparation peut être faite avec les constituants à température ambiante, toutefois si on veut avoir un vaccin stable à long terme, il vaut mieux les chauffer tous les deux à 30°C préalablement. La quantité exacte de la préparation antigénique est aspirée dans une seringue, ainsi que la même quantité d'adjuvant dans une deuxième seringue. Les deux seringues sont reliées par un embout en T à deux entrées. Par des pressions successives sur les pistons des deux seringues (mouvement de va et vient) pendant plusieurs minutes, les deux produits se mélangent peu à peu. Le vaccin est alors prêt à l'emploi.

Les animaux vont donc pouvoir être immunisés avec de la C2 avant de subir une infection expérimentale à *Trypanosoma congolense*. Il faut donc envisager les techniques de suivi de la réponse immunitaire des animaux en pré et post infection, ainsi que celles permettant la préparation de la dose infectante en parasite.

Pratique de l'électrophorèse sur mini gel



➤ Il faut tout d'abord préparer le montage destiné à recevoir le gel. Les petites plaques de verre doivent être préalablement nettoyées à l'alcool et séchées. Il faut ensuite constituer une sorte de sandwich avec une plaque de verre, un joint souple qui court sur le bord de trois cotés de la plaque, et la deuxième plaque de verre. Le tout est maintenu par deux pinces.

➤ Il faut alors préparer le gel. Pour la confection d'un mini gel à 12% d'acrylamide, il faut préparer environ 10 ml de mélange final. Dans un bêcher, on effectue la préparation suivante :

Eau distillée	3,3 ml
Stock d'acrylamide à 30%	4 ml
1,5M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% APS	0,1 ml
TEMED	10 μ l

Les deux derniers produits doivent être rajoutés au dernier moment car ils déclenchent assez rapidement la transformation de la solution en gel.

Pour obtenir un gel avec gélatine, il faut rajouter 0,1 % de gélatine au mélange.

➤ Le gel est coulé dans le montage, un peigne à huit puits est glissé par le haut entre les deux plaques de verres. Après quelques minutes, quand le gel a bien pris, on le rince à l'eau distillée, et on retire le peigne, les pinces et le joint. Le reste du montage est installé dans un support prévu à cet effet ; ce support peut recevoir le montage pour deux gels en même temps.

➤ Le support est installé dans sa cuve à électrophorèse remplie de solution tampon et préalablement amené à la température de 4°C par un système de refroidissement, système qui fonctionnera pendant toute l'électrophorèse. Le réservoir supérieur du montage est lui aussi rempli de la même solution tampon que la cuve.

Composition de la solution tampon dite « running buffer » :

Dissoudre 75 g de Tris base et 360 g de glycérine dans 4000 ml d'eau distillée.

Ajuster le pH à 8,3 avec du HCl 1N.

Compléter avec de l'eau distillée pour obtenir un volume final de 5 000 ml.

Prendre 900 ml du mélange obtenu, y ajouter 45 ml de SDS à 10 % et compléter avec de l'eau pour atteindre un volume de 4 500 ml.

Cette préparation finale est utilisée tel quelle.

➤ Il faut alors préparer les échantillons à analyser. Généralement, on mélange 25 μ l d'un échantillon avec 25 μ l d'une deuxième solution tampon ne contenant pas de SDS. On charge alors les gels, avec une seringue adaptée, à raison de 10 μ l des préparations par puits du gel avec gélatine et 40 μ l par puits pour le gel sans gélatine. Le dernier puits de chaque gel contient le poids moléculaire. On utilise du Rainbow, en mélangeant 10 μ l de ce dernier avec 10 μ l de solution tampon ; on

fait bouillir le tout pendant 2 mn. On utilise ensuite 10 μ l de la solution obtenue pour chaque gel.

➤ Le système est alors branché en voltage continu maximum. Le courant est d'abord réglé sur 25 mA par gel pendant quelques minutes pour tasser les préparations, puis sur 5 mA par gel et ce durant toute une nuit. Les gels sont démoulés quand la migration est arrivée à environ un centimètre du bas du gel.

➤ Le devenir des gels dépend alors de la présence ou pas de gélatine dans leur composition.

Le gel avec gélatine est lavé deux fois 20 mn dans du Tris 100 mM pH 6,8 contenant 20 % de glycerol, puis mis en incubation dans une solution de Mes 50 mM pH 6,2, contenant 0,5 mM DTT et 1 mM EDTA, pendant 3 h à 37°C puis toute une nuit à température ambiante. Il est ensuite coloré au bleu de Coomassie.

Le gel sans gélatine est lavé trois fois 10 mn dans du Tris 100 mM pH 6,8 contenant 20 % de glycérol, puis est transféré sur une feuille de nitrocellulose par électroblotting.

Méthode du Western Blot



1. Transfert du gel par électroblotting

Le gel est plaqué contre la feuille de nitrocellulose, préalablement découpée à la même taille que le gel, par des feuilles de papier, deux éponges prévues à cet effet, et les deux grilles de l'appareil d'électroblotting. Ces dernières, par des systèmes de crochets s'emboîtant l'un dans l'autre, assurent la cohésion et la stabilité de l'ensemble. Ce « sandwich » est mis en place dans la cuve de l'appareil, qui contient la solution tampon de transfert [NaHCO_3 3,36 g + Na_2CO_3 1,272 g le tout dissous dans 4 litres d'eau distillée et 1 000 ml de méthanol]. Un système de refroidissement est mis en place, puis l'ensemble est branché et soumis à un courant de 70 V pendant 3 h, ou de 15 V toute une nuit.

Le transfert terminé, la feuille de nitrocellulose est récupérée et mise à sécher entre deux feuilles de papier 30 mn dans un four à 37°C.

2. Révélation du blot

La feuille de nitrocellulose est colorée 5 à 10 mn dans du Rouge Ponce, puis rincée à l'eau. Les principales bandes de migration des protéines sont alors visibles, leur emplacement est marqué par de petits trous d'aiguilles.

La feuille est ensuite mise à tremper 30 mn à température ambiante dans un mélange de lait-PBS à 5 %, pH 7,2 afin de la bloquer.

L'anticorps est dilué dans le même mélange à base de lait. S'il provient d'animaux peu immunisés comme la ND13, il y est ajouté au 1/200^{ème}, sinon au 1/1 000^{ème}.

La feuille de nitrocellulose est mise à tremper dans le mélange lait-PBS-Anticorps pendant toute une nuit à 4°C.

Le lendemain, la feuille est rincée trois fois 10 mn dans du PBS, puis mise à incuber 15 mn dans du lait à température ambiante.

Elle est ensuite mise à incuber 1 h à température ambiante avec le conjugué marqué à la peroxydase. Le conjugué utilisé est dilué au 1/500^{ème} dans du lait-PBS à 5 %.

La feuille est ensuite rincée au PBS puis mise à incuber 5 mn dans la solution A [100 mM Tris pH 7,4 + 200 mM NaCl].

Elle est ensuite révélée avec la solution de révélation [60 mg de chloronaphtol à dissoudre dans 20 ml de méthanol + 100 ml de solution A + 60 µl d' H_2O_2 à 30 %].

Les bandes étant visualisées, la feuille est rincée à l'eau (cela accentue la coloration), puis mise à sécher avant lecture.

Electrophorèse sur grand gel



Le principe est globalement le même que pour les mini gels.

➤ Il faut tout d'abord préparer le montage destiné à recevoir le gel. Les plaques de verre doivent être préalablement nettoyées à l'alcool et séchées. Elles sont posées l'une sur l'autre, séparées par deux tiges en plastique positionnées de part et d'autre des plaques, constituant des joints latéraux. Le tout est maintenu par un système de serrage à vis et installé sur une languette de caoutchouc faisant office de joint inférieur par compression vertical du montage.

➤ Il faut alors préparer le gel. Pour la confection d'un grand gel à 12 % d'acrylamide (cette concentration permet une séparation optimale des protéines ayant un poids moléculaire compris entre 14,5 et 97 KD), il faut préparer environ 40 ml de mélange final. Dans un bêcher, on effectue la préparation suivante :

Eau distillée	3,3 ml
Stock d'acrylamide à 30 %	4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	10 µl

Les deux derniers produits doivent être rajoutés au dernier moment car ils déclenchent assez rapidement la transformation de la solution en gel.

➤ Le gel est coulé dans le montage. En attendant qu'il prenne bien, on prépare la solution de « stacking », 5 à 6 ml par gel :

Eau distillée	3,4 ml
Stock d'acrylamide à 30 %	1 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	1,5 ml
10 % SDS	60 µl
10 % APS	60 µl
TEMED	6 µl

Après quelques minutes, quand le gel a bien pris, on le rince à l'eau distillée. Le stacking est coulé par-dessus et le peigne à deux puits est inséré entre les deux plaques de verres, avant que la prise du stacking. Quand le gel est prêt, on retire les plaques de verres de la lame de caoutchouc et le reste du montage est installé dans la cuve à électrophorèse maintenue à 4°C par un système de refroidissement. Cette cuve comme le réservoir supérieur du montage est remplie de la même solution tampon que pour les mini gels.

➤ Les puits sont alors chargés à la seringue, le grand puits principal recevant la solution de C2 purifié, le petit puits latéral 5 à 10 µl de poids moléculaire mélangé pour moitié avec un tampon, souvent le rainbow.

➤ La cuve est alors mise sous tension à raison de 5 h à 50 mA par gel ou toute une nuit à 20 mA par gel (une cuve pouvant recevoir deux gels simultanément). Puis les gels sont démoulés et coupés pour récupérer la C2.



2.3 Le suivi de la réponse immunitaire en pré et post infection

La réponse immunitaire des animaux est suivie à la fois vis à vis de la C2, mais aussi pour la congopaine naturelle. Il est donc nécessaire d'avoir un stock de ce deuxième antigène, ce qui implique de pouvoir l'extraire du parasite et de le purifier.

La congopaine naturelle est obtenue directement à partir de trypanosomes. Pour cela, on utilise des rongeurs chez qui les parasites peuvent se multiplier sans nuire à l'état général de leur hôte. Souris et rats sont immunodéprimés par radiations. Cela évite une élimination spontanée des trypanosomes, avec une parasitémie en courbe en cloche, ce qui se produit habituellement avec *T. congolense*. On maintient ainsi un taux de parasites sanguins croissants chez ces animaux, ce qui permet par la suite de récupérer un plus grand nombre de trypanosomes et selon un protocole plus souple.

On se sert initialement de souches de parasites déjà stabilisées, comme la souche C49 de *T. congolense*. Un premier lot de souris est irradié 5 mn à 600 rad ; puis le parasite leur est injecté par voie intra péritonéale. La parasitémie est contrôlée trois à quatre jours après l'infection par le prélèvement de quelques gouttes de sang à la queue de l'animal et observation au microscope entre lame et lamelle. Quand le nombre de protozoaires atteint un plateau, les souris sont sacrifiées par inhalation d'un gaz toxique volatil, et leur sang cardiaque est ponctionné. On récupère environ 1 ml de sang par souris. Un deuxième groupe d'animaux, mais de rats cette fois, est immunodéprimé suivant le même protocole que précédemment et inoculé à son tour à partir du sang des souris. Ce deuxième passage sur rongeurs permet d'augmenter encore le nombre de trypanosomes que l'on pourra « récolter » au final. Après un nouveau délai de trois à quatre jours, les rats sont sacrifiés. Afin de récupérer un maximum de sang, le cœur est ponctionné à thorax ouvert puis incisé, et la zone porte est sectionnée. Après avoir rajouté de l'héparine et du PBS dans la cavité thoracique ensanglantée, on récupère le mélange obtenu à l'aide d'une seringue, et on le centrifuge (à 4°C, 5 mn à 3 000 G) dans le but d'éliminer les cellules, surtout les globules rouges. Il faut alors purifier la préparation en la filtrant par passage sur une colonne à chromatographie contenant du DE 52.

La colonne est remplie environ au 3/5^{ème} avec le gel qui se solidifie rapidement en formant un filtre. Celui ci ne doit jamais devenir sec, ce qui nécessite de fréquents rinçages au PBS. Le sérum est versé dans la colonne, suivi par un rinçage au PBS. Tout au long de la filtration, on vérifie que les trypanosomes restent bien vivants, et que les cellules sanguines ne passent pas, par observation entre lame et lamelle d'une goutte de filtrat au microscope. Une deuxième série de filtration-rinçage est effectuée. La solution obtenue est une nouvelle fois centrifugée (2 000 tr, 10 mn), deux fois de suite, en jetant le surnageant, de façon à ce que les trypanosomes soient tassés au fond des tubes. Les parasites sont alors remis en suspension dans une solution tampon (1) qui élimine les dernières traces d'hémoglobine, et associée à une centrifugation plus forte (9 000 tr pendant 20 mn), lyse les trypanosomes. L'étape suivante consiste à purifier la congopaine ainsi mise en solution puis à la concentrer.

Composition de la solution tampon 1

PBS sans calcium ni magnésium + 50 mM NaCl	20 ml		
EDTA 2,5 mM (PM372)			
MMTS	2 μ l/10ml	□	Inhibiteurs de protéases
DCI 10 mM	1/500		
Pepstatin	1/10000		
Triton (oxyde d'éthanol) 100M	1/1000		

La purification de la congopaine naturelle se fait par chromatographie d'immuno-affinité sur colonne. Le principe de base est globalement le même que pour la purification de la C2, les différents montages et branchements de la colonne sont similaires, mais on utilise cette fois les propriétés antigéniques de la protéine. Le gel utilisé contient des anticorps monoclonaux anti-congopaine, d'où son nom de gel d'affinité. Ces anticorps sont fixés par covalence aux supports poreux que représente le gel, par l'intermédiaire d'une chaîne latérale : le bras fixateur. Une colonne est remplie de ce gel d'affinité et lavée. On y fait alors passer la solution aqueuse contenant la cystéine protéase. Celle-ci est retenue dans le gel par la formation de complexes antigène-anticorps. Les contaminants en solution passent librement, ce qui se traduit par un pic important sur l'enregistreur. Pendant toute la durée de cette phase dite de fixation, les fluides circulants sont recueillis et testés par un zymogramme afin de détecter toute fuite de l'enzyme. On élimine ensuite toute trace de produits indésirables par des lavages successifs avec du PBS, l'enregistrement revient progressivement à la ligne de base. Alors, on élue la protéine en décomposant le complexe. Pour cela, on modifie les conditions du milieu en faisant passer dans la colonne une succession de solutions : d'abord du NaCl 0,3 M, puis du NaCl 1 M et enfin un mélange de Glycocolle et d'HCl à pH 2,8. Trois pics consécutifs d'amplitude différente apparaissent sur le graphe, le premier est souvent plus petit que les deux autres. Les différents filtrats correspondant à ces variations sont recueillis dans trois tubes différents et testés par un zymogramme. La congopaine est retrouvée essentiellement dans le dernier tube, et parfois un peu dans le premier. La protéine peut enfin être concentrée suivant la même méthode que celle utilisée pour la C2, c'est à dire par centrifugations multiples en chambre de concentration. Les protéines sont congelées et peuvent servir de stock d'antigènes pour révéler la synthèse d'anticorps par les bovins.

La réponse immunologique des animaux est principalement suivie par des tests ELISA [14, 22, 36]. C'est une méthode immuno-enzymatique de dosage des anticorps qui est très sensible, fiable et réalisable même dans un laboratoire peu équipé. Cette méthode repose sur la propriété que possèdent certains matériaux insolubles, notamment les polystyrènes, de fixer les grosses molécules protéiques, telles que les anticorps et les antigènes, et ce par le biais de liaisons chimiques non dénaturantes et réversibles.

Le principe de base est le suivant. L'antigène est adsorbé sur des plaques à micro-hémagglutination en polystyrène rigide creusées de 96 cupules. Les dilutions des sérums à tester sont ensuite mises à incuber sur ces plaques. Les anticorps spécifiques, s'ils sont présents dans les sérums, se fixent sur les anticorps correspondant. Le matériel qui n'a pas réagi est éliminé par plusieurs lavages. On ajoute alors un conjugué anti-immunoglobuline marqué à la peroxydase, d'où la formation d'un complexe antigène-anticorps-conjugué fixé sur les parois des cupules. Après élimination par lavage de l'excès de conjugué, l'addition de substrat, en l'occurrence de l'eau oxygénée, et de chromogène, de l'orthodiamisidine, produit un changement de couleur de la paroi du godet. Ce changement est proportionnel à la quantité d'anticorps présents dans le sérum. La lecture peut s'estimer à l'œil nu, et pour plus de précision, on utilise un spectrophotomètre adapté au système (ici, un Titertk Multiskan micro-ELISA auto-reader Type MCC 340, Finland). Les résultats sont exprimés en différence d'absorbance, par exemple entre l'absorbance des échantillons, et l'absorbance des sérums de pré-immunisation des mêmes animaux.

Pratique d'un test ELISA



- Les plaques à micro-hémagglutination sont stockées à la température de 4°C.
- Les cupules des plaques sont remplies avec une solution d'antigène, ici de la congopaine. En général on remplit chaque cupule avec 100 µl (on peut utiliser des volumes de 50 à 200 µl) de CP diluée au 1/200^{ème} dans du PBS. On laisse incuber la plaque pour que l'antigène s'adsorbe sur le polystyrène. Le temps d'incubation étant fonction de la température : cela va de 2 heures à 37°C, jusqu'à toute une nuit sur de la glace (cette dernière solution étant la meilleure).
- Après l'incubation la plaque est rincée trois fois au PBS Twin.
- On ajoute ensuite 100 µl de PBS TW 0,5 % à 1 % BSA (ou ELISA buffer) dans chaque cupule, afin de « bloquer » la plaque (on comble les zones de la cupule non occupées par de l'antigène) et on incube 1 heure sur glace. Il ne faut pas oublier de faire un blanc, de laisser une ou plusieurs cupules sans sérum, pour la lecture en fin de manipulation.
- Après avoir éliminé le bloquant en renversant la plaque sur un papier absorbant, on dépose les sérums à tester dans les cupules, toujours à raison de 100 µl par cupule. Le protocole est alors variable ; les sérums sont souvent dilués au 1/100^{ème}, et dans le cadre de cette expérience, l'incubation est d'une nuit sur glace (protocole préférable pour les sérums dilués ou peu immuns).
- Les plaques sont ensuite rincées trois fois et les cupules incubées trois fois 10 mn avec du PBS Twin.
- On effectue alors un deuxième blocage de 30 minutes sur glace avec de l'ELISA buffer, comme précédemment.
- Les plaques sont vidées et on ajoute alors le conjugué dilué dans l'ELISA buffer (toujours 100 µl par cupule), la dilution étant fonction du conjugué utilisé (cela varie du 1/40 000 pour le conjugué dit lab 1 à 1/2 000 pour le conjugué ICN). On laisse incuber 1 heure sur glace.
- Les plaques sont ensuite rincées trois fois et les cupules incubées trois fois 10 mn avec du PBS Twin. On rince ensuite une dernière fois au PBS simple.
- On peut alors ajouter 100 µl de substrat dans chaque cupule. La plaque est agitée et la lecture se fait une vingtaine de minutes plus tard, la plaque étant mise à l'abri de la lumière pendant cette période, lecture par absorbance, grâce à un spectrophotomètre.

Ce type de réaction peut être utilisé pour vérifier la bonne corrélation entre la congopaine de synthèse et celle d'origine parasitaire comme il a été vu précédemment, pour tester la réponse immunitaire des animaux vis-à-vis de différentes cystéines protéases, pour évaluer l'évolution de cette même réponse au fur et à mesure des rappels vaccinaux ou de l'installation de la trypanosomose, en bref, les tests ELISA sont très couramment utilisés dans le cadre de ces travaux.

Mais pour suivre l'évolution d'une infection expérimentale à *Trypanosoma congolense*, il faut infecter les animaux et donc encore récolter du matériel infectant.

Dans le but d'infecter les trois bovins immunisés contre trois cystéines protéases différentes, une souris est irradiée comme cela a été vu auparavant. On lui injecte une souche stabilisée de *T. congolense*, la souche ILI80 (provenant du Serengeti, Tanzanie). Environ six jours plus tard, on récupère de son sang dans un peu d'héparine, en lui entaillant l'extrémité de la queue. De retour au laboratoire, on effectue un comptage des trypanosomes recueillis ainsi, à l'aide d'une lame quadrillée étalonnée et d'un microscope. La dose infectante pour un animal doit être de 1.10^5 trypanosomes. On dilue alors la quantité nécessaire de sang dans du PBS de manière à obtenir cette quantité dans 2 ml de solution. Ce mélange final est ensuite injecté par voie intra-veineuse aux animaux. Dans le cadre de l'autre expérience, celle concernant les 24 zébus, l'infestation devra se faire par l'intermédiaire de glossines, préalablement infectées par la même souche de trypanosome que précédemment.

Les raisons de l'orientation de ces recherches vers un vaccin anti-maladie pour la trypanosomose et les méthodes utilisées étant définies, il est temps d'envisager l'expérience elle-même.

3. L'expérience par elle même

Il va surtout être question ici de l'expérience destinée à déterminer le choix d'un antigène immunisant, puisque c'est ce dont je me suis principalement occupée durant ce stage à l'ILRI.

3.1 La phase d'immunisation des animaux.

Ce sont trois zébus de race Boran, donc trypanosensibles, qui ont servi de base à cette étude. Ils ont été choisis parmi les animaux du protocole de 1998, et plus précisément du groupe immunisé avec de la C2. Trois mâles d'environ 16 mois ont été sélectionnés après une visite sanitaire destinée à éliminer tout bovin souffrant d'une pathologie annexe (en particulier la fièvre aphteuse, des cas s'étant déclarés dans une des fermes de l'ILRI, et l'anaplasmose). Ces animaux ont ensuite été maintenus dans une étable isolée et protégée des glossines et ce pour toute la durée de l'expérience. Ce confinement est nécessaire afin d'empêcher toute infestation accidentelle par des trypanosomes. Les animaux sont nourris de foin et de granulés et ont de l'eau à volonté. Des vachers sont chargés de leur entretien et d'une surveillance quotidienne.

La phase d'immunisation a commencé le 15 avril 1999, et s'est prolongée jusqu'au 11 juin 1999, date du quatrième et avant dernier rappel. Pendant cette période, les trois zébus ont reçu des doses immunisantes répétées environ tous les quinze jours. Chacun d'eux a été immunisé avec un antigène différent : la protéine de 28 KD, la protéine de 35 KD, et la protéine C3. Du sang des trois animaux a été récolté une quinzaine de jours après les injections. A chaque fois, le plasma est recueilli après centrifugation (20 mn à 4°C à 14 000 g) et mis en petits tubes labellés qui sont immédiatement congelés à -70°C.

Ces prélèvements ont servi, tout d'abord, à suivre la réponse immunitaire des trois animaux vis-à-vis de la congopaine native pendant cette première phase de vaccination. Des tests ELISA ont été effectués afin de savoir comment les anticorps synthétisés par les zébus reconnaissent l'enzyme trypanosomiale. Un premier test effectué avec un recouvrement antigénique de la plaque de polystyrène au 1/200ème, après lecture au spectrophotomètre, a révélé une nette différence entre l'animal BS 406, immunisé avec la fraction de 35 KD et les deux autres bovins. Alors que le taux en anticorps anti-congopaine de BS 390 et BS 392, respectivement immunisés avec de la C3 et la fraction de 28 KD, reste stable tout au long des rappels, le taux de BS 406 croît considérablement à chaque rappel. Cela a été confirmé par un deuxième test, centré uniquement sur cet animal. Ces premiers enseignements vont dans le sens de l'hypothèse qui semblait la plus probable au départ, c'est-à-dire une meilleure immunisation avec la forme la plus lourde de la protéine recombinante C2.

Protocole d'immunisation des trois bovins

▪ Dose et protéine utilisées

BS 390	immunisé avec la C3	100 µg
BS 392	immunisé avec la 28	100 µg
BS 406	immunisé avec la 35	60 µg

▪ Dates des différentes injections

Effectuées pour chaque animal avec l'antigène défini ci-dessus.

Immunisation	15/04/99	Prise de sang	25/04/99
1 ^{er} rappel	29/04/99		10/05/99
2 ^{ème} rappel	14/05/99		24/05/99
3 ^{ème} rappel	28/05/99		07/06/99
4 ^{ème} rappel	11/06/99		21/06/99

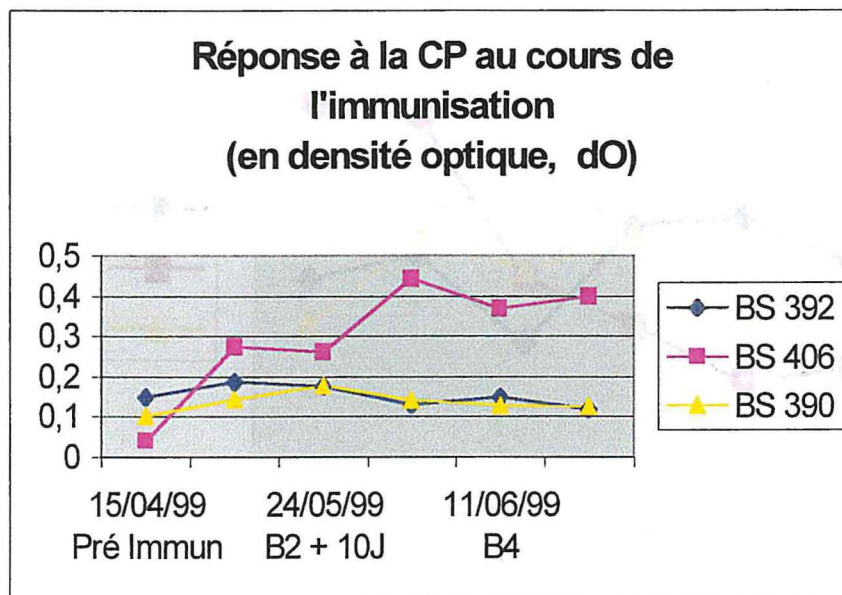
▪ Dernier rappel

Effectué cette fois avec de la congopaine native pour les trois animaux

5 ^{ème} rappel	12/07/99	Prise de sang	12/07/99
-------------------------	----------	---------------	----------

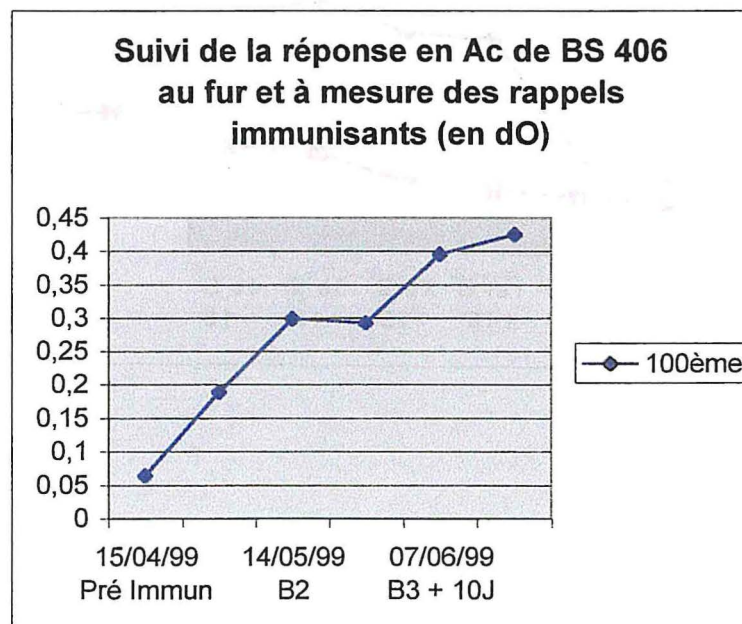
puis 2 fois par semaine.

Etude de la réponse des zébus vis-à-vis de la congopaine native (CP)

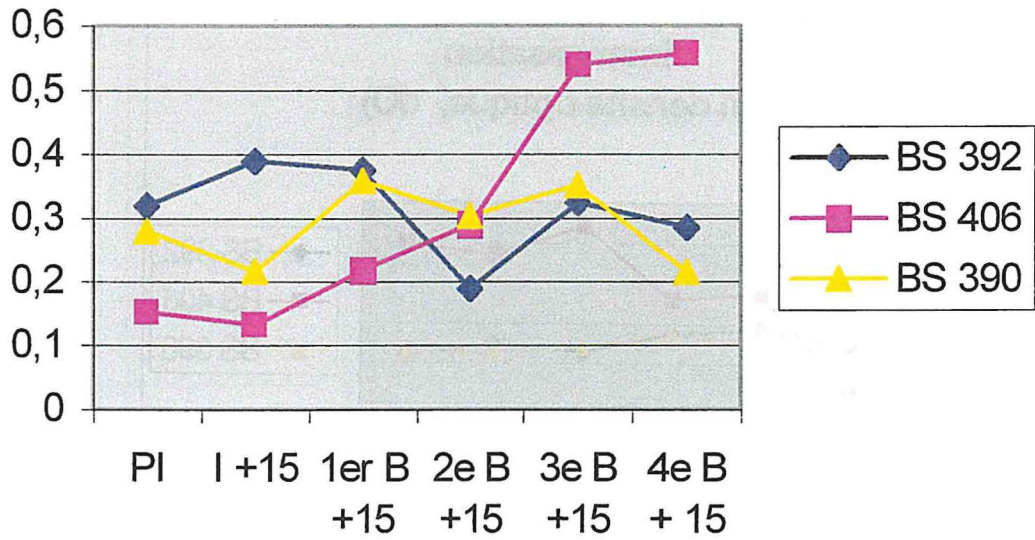


Dès la première immunisation, l'animal BS 406 s'avère mieux immunisé contre la CP que les deux autres zébus, et la différence ne fait que s'accroître avec les rappels.

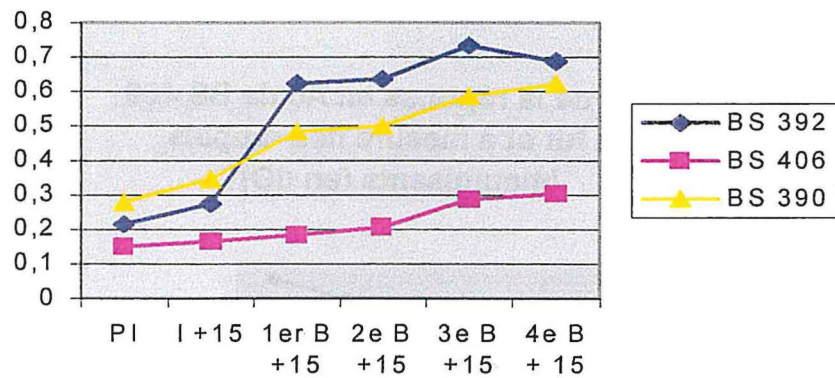
Sur le graphe ci-dessous, la croissance régulière du taux d'anticorps anti-CP du zébu BS 406 est bien visible. Les dosages ont été effectués en pré-immunisation, le jour du 1^{er} puis du 2^{ème} rappel, 10 jours après ce 2^{ème} rappel (d'où le plateau sur la courbe), et enfin 10 jours après les 3^{ème} et 4^{ème} rappels.



Suivi de la réponse à l'immunisation (CP au 1/50ème, en dO)



Réponse à la C2 au cours de l'immunisation (en dO)



Un troisième test ELISA a été réalisé alors, plus précis grâce à une concentration antigénique plus importante, au 1/50^{ème}. La même « suprématie » de

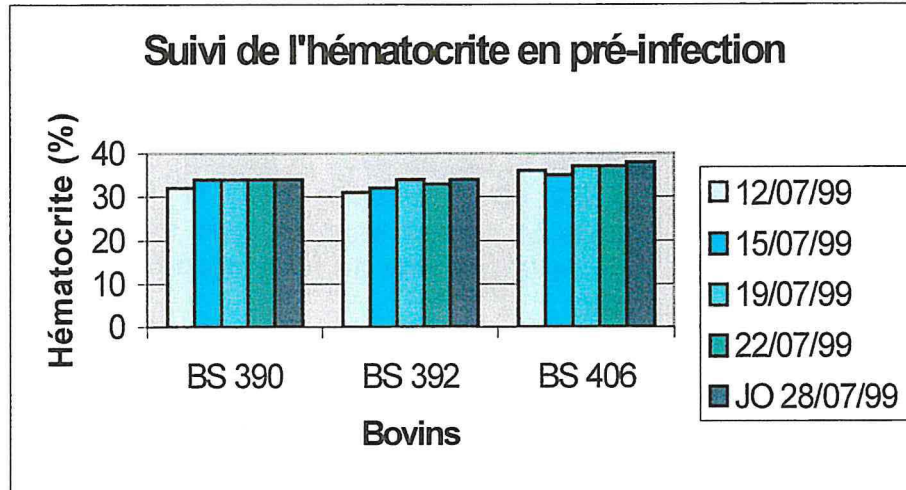
l'animal BS 406 a été démontré, même si les réponses en anticorps des deux autres animaux se sont avérées plus modulées que sur la courbe précédente.

La réponse immunitaire des trois animaux a aussi été testée en ELISA vis-à-vis de la protéine recombinante C2. Les anticorps des zébus immunisés avec la C3, de structure relativement voisine de la C2, ou avec la fraction de 28 KD ont bien réagi, contrairement au taurillon BS 406 immunisé avec la fraction de 35 KD. Le phénomène de glycosylation de ce dernier fragment (par rapport à celui de 28 KD) semble modifier la structure de la protéine de telle façon que les antigènes qu'elle induit reconnaissent peu la C2.

Le dernier rappel, a eu lieu le 12/07/99, et cette fois, tous les bovins ont reçu le même antigène. Les doses immunisantes ont été préparées avec de la congopaine native, 10 mg, mélangée avec du PBS de façon à obtenir 1 ml au total. Cette solution a ensuite été mélangée avec 1 ml de l'excipient huileux, suivant la manipulation décrite précédemment. Le « vaccin » obtenu a été finalement injecté aux animaux par voie sous cutanée dans le fanon jugulaire et en quatre points d'injection (deux de chaque côté du fanon). A partir de cette date, des prises de sang ont été effectuées deux fois par semaine pour établir une valeur de base de l'hématocrite de chaque individu, et pour continuer de suivre leur réponse immunitaire.

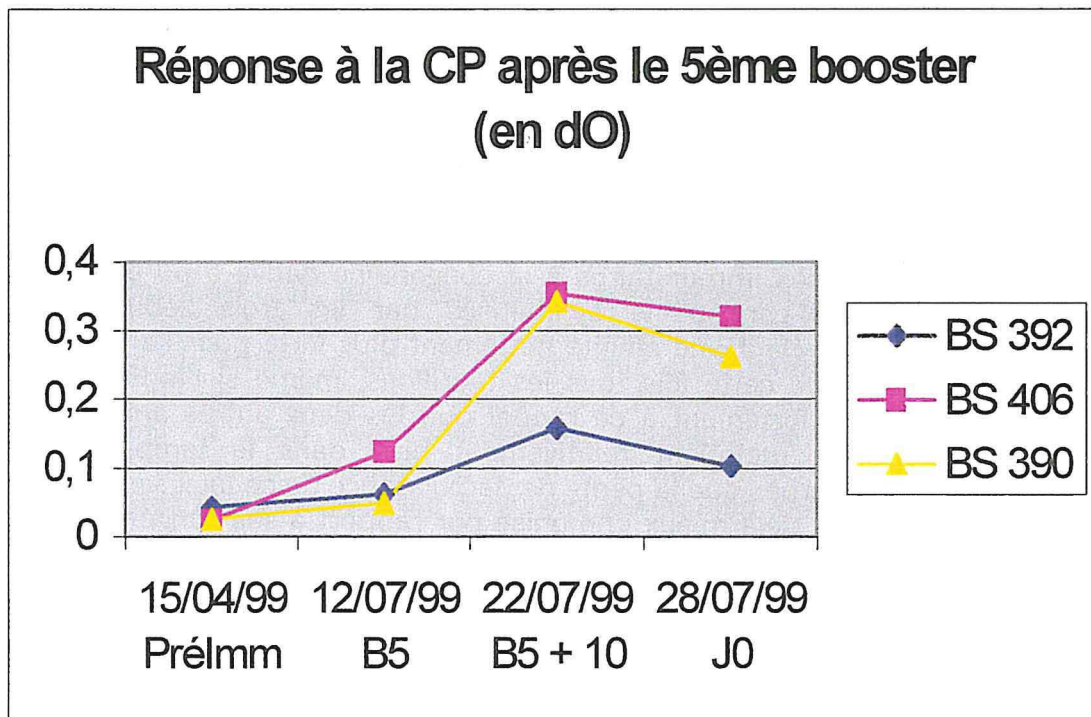
L'hématocrite représente le volume occupé par les éléments figurés du sang, les globules, dans un volume donné de sang. Elle est obtenue ici selon la méthode standard : des tubes à hématocrite sont remplis de sang frais et bouchés à leur extrémité inférieure par une pâte. Ces tubes sont alors centrifugés cinq minutes à 12 000 g. La lecture de la valeur de l'hématocrite se fait alors avec une règle spéciale et est exprimée en pourcentage. La période de pré-immunisation a permis de définir des hématocrites moyennes, valeur de référence pour la suite de l'expérience, surtout en phase de post-infection puisque, comme il sera vu ultérieurement, un des symptômes majeurs des trypanosomoses est représenté par une chute de l'hématocrite des animaux parasités [46].

Suite au cinquième et dernier rappel, une évolution significativement différente concernant les réponses immunitaires à la congopaine native a pu être relevée. Le taux d'anticorps anti-congopaine synthétisés par les trois zébus s'est accru considérablement, révélant une affinité nettement plus forte pour l'antigène naturel. Ce processus concerne cette fois tous les taurillons, même si l'individu BS 392 a semblé réagir moins fortement à ce rappel que les deux autres animaux. Ce taux élevé d'anticorps se maintient relativement bien dans le temps, et on peut remarquer sur les courbes que la pente de décroissance de ce taux semble plus faible pour le zébu BS 406, déjà mieux immunisé par rapport à ses congénères, que pour ces derniers. Mais cela reste encore à vérifier.



Valeur moyenne de l'hématocrite :

pour BS 390	34%
pour BS 392	33%
pour BS 406	37%



Cette première partie de l'expérience nous a confirmé que la fraction de 35 KD était celle qui induisait la meilleure réponse humorale pour la congopaine native mise à part la congopaine native elle-même. Mais cela ne prouve en rien son efficacité à diminuer la pathogénie induite par les trypanosomes. L'épreuve de la maladie est indispensable. Il faut donc maintenant tester les trois modes d'immunisation lors d'infection par *trypanosoma congolense*.

3.2 La phase post-infection

L'infection expérimentale par voie intra veineuse des trois bovins a eu lieu le 28 juillet 1999 selon le protocole décrit précédemment.

En principe, lors d'infection naturelle, la phase d'incubation de la maladie est de dix à quinze jours. La trypanosomose animale se traduit alors par un syndrome de gravité variable suivant les individus. Tous les modes d'évolution sont possibles, de l'infection suraiguë mortelle en trois à quatre semaines, à l'infection chronique durant des mois. Néanmoins, chez les bovins africains, l'évolution chronique, caractérisée par des parasitémies intermittentes, est la plus fréquente [3, 15, 20,42,46]. La maladie commence alors par une phase d'hyperthermie correspondant au premier pic de parasitémie. Deux à trois semaines après la piqûre infectante, le nombre de globules rouges, le taux d'hémoglobine et l'hématocrite chutent. Ces signes d'anémie représentent le symptôme majeur de la maladie. Les animaux parasités depuis longtemps s'alimentent peu, leur croissance est freinée, et ils deviennent progressivement cachectiques [9, 24, 30]. Ils présentent souvent des oedèmes sous-cutanés, parfois on observe des problèmes de kératite ulcéraire, ou des troubles nerveux. Chez les femelles, des problèmes de reproduction apparaissent comme des baisses de fécondité, des avortements, des chutes de production laitière [31, 50]. On signale aussi souvent un larmolement persistant des bovins. La trypanosomose induisant aussi des phénomènes immunosuppresseurs chez les malades, une recrudescence de maladies intercurrentes peut survenir dans le troupeau [26, 47,55, 57, 59].

Le mode d'évolution de la maladie est fonction de la pathogénicité des trypanosomes et de la charge parasitaire, sans oublier la sensibilité de l'hôte et les conditions d'environnement. Les évolutions suraiguës surviennent essentiellement chez les races importées, généralement beaucoup plus sensibles à l'infection que les races locales. Mais, même parmi ces dernières, des variations individuelles et raciales existent, le phénomène de trypanotolérance intervenant beaucoup. De plus, les conditions d'élevage peuvent être déterminantes pour la survie d'un individu. Dans les conditions qui généralement prévalent en Afrique, les animaux chroniquement infectés succombent à l'occasion de stress nutritionnels (saison sèche), pathologiques (surinfections bactériennes ou parasitaires) ou physiologiques (sevrage, parturition, lactation, transhumance).

Il n'existe pas de lésion typique de la trypanosomose. Une hypertrophie ganglionnaire, splénique et hépatique est très souvent observée en début de maladie, alors qu'en phase chronique les organes lymphoïdes ont plutôt tendance à être en hypoplasie. Une atteinte cardiaque, le plus souvent sous forme de myocardite dégénérative, est une cause fréquente de la mort des animaux.

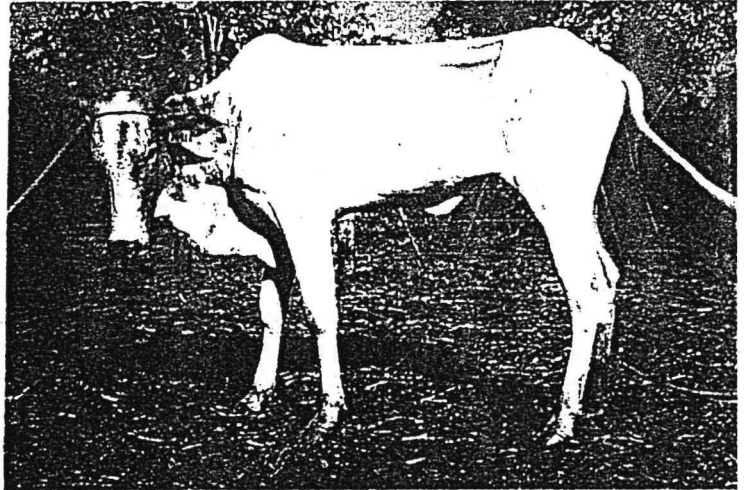
L'anémie des trypanosomoses animales [10, 46] s'établit selon deux phases. Pendant la première phase, l'anémie accompagne la parasitémie. Elle résulte essentiellement d'une hémolyse extra-vasculaire : les globules rouges sont détruits par le système phagocytaire dans la rate, le foie, dans le torrent circulatoire et la moelle osseuse. L'anémie est alors normochrome et normo ou macrocytaire. En phase chronique, elle cesse d'être régénérative et devient progressivement normocytaire ou microcytaire, et normo ou hypochrome. Cela traduit alors un dysfonctionnement de la moelle osseuse.

Quelques aspects de la trypanosomose



Chancre d'inoculation 13 jours après la piqûre.
On note de la congestion et de l'œdème ainsi qu'une infiltration cellulaire diffuse de lymphoblastes et de cellules plasmocytaires.

(D'après Murray et al)



Zébu cachectique suite à une trypanosomose chronique



Infiltration cellulaire intense du myocarde
d'un bovin atteint de trypanosomose.

(D'après Murray et al)

Dans ce cadre, la surveillance des trois zébus après inoculation du parasite doit se faire sur plusieurs plans.

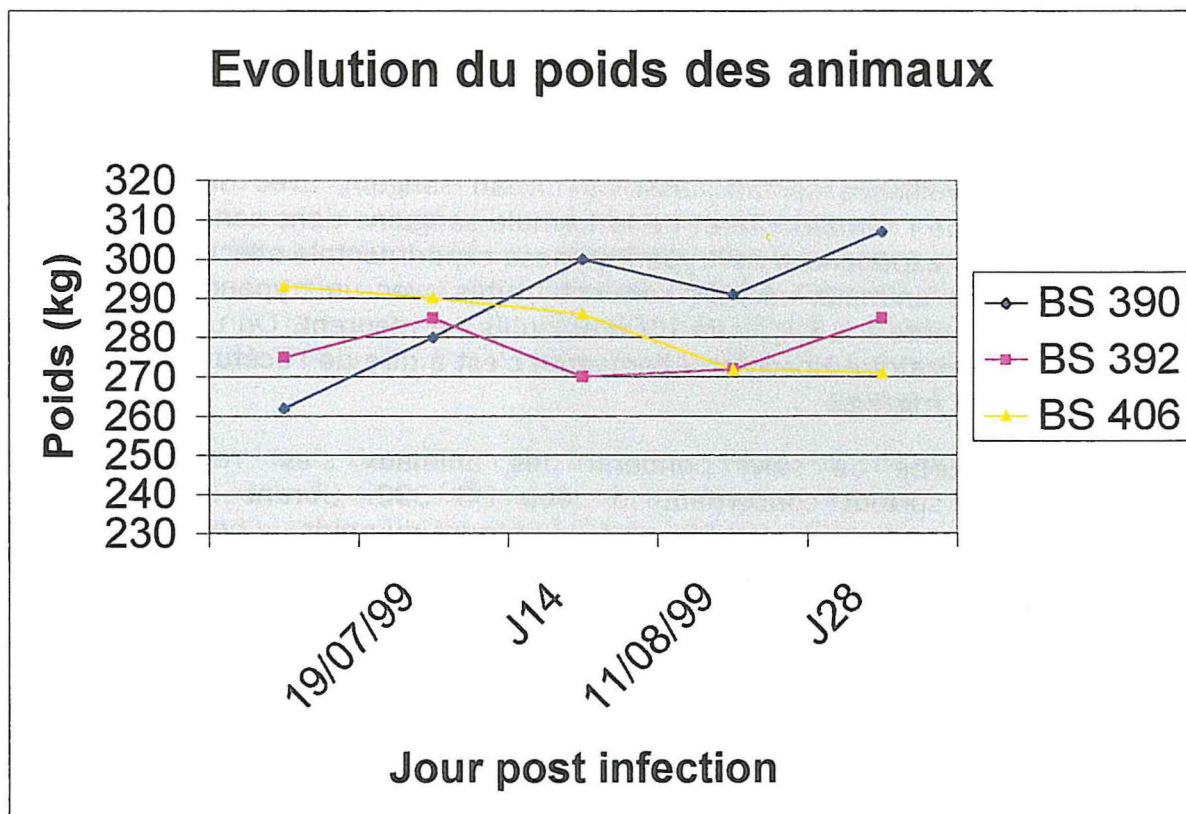
Au niveau de leur état général tout d'abord, avec une pesée hebdomadaire des trois zébus. Cela se fait grâce à une balance électronique qui est installée le jour voulu sous la dernière planche du couloir de contention. Pesée et prise de sang sont effectuées dans le même temps, ce qui diminue les manipulations des animaux ainsi que leur stress. Les soigneurs vérifient aussi quotidiennement l'alimentation, un état de faiblesse éventuel, voire l'apparition d'un quelconque événement inhabituel, celui-ci est alors signalé immédiatement, faisant intervenir le vétérinaire de l'élevage si besoin.

La surveillance se fait aussi au niveau sanguin, avec des contrôles de la parasitémie, de l'hématocrite et de la formule sanguine dans son ensemble. Quelles que soient les expériences de trypanosomose expérimentale effectuées à l'ILRI, il est prévu que les animaux infectés seraient traités avec un trypanocide dès que leur hématocrite chute à 15 %, afin d'éviter qu'ils ne meurent. On utilise pour cela du BerenilND (laboratoire Hoechst, Allemagne) c'est à dire de l'acéturate de diminazène à la dose de 7 mg/kg.

La courbe de suivi pondéral des animaux s'est révélée relativement surprenante, surtout concernant le zébu BS 390. Durant les deux mois de l'expérience, ce taurillon n'a pas cessé de prendre du poids, la pente de la courbe ne faisant que s'infléchir légèrement en troisième semaine post infection. Ce résultat associé à ceux obtenus en pré immunisation et reliés aux autres données de post infection est difficilement explicable face aux connaissances actuelles liées aux immunisations des années précédentes. N'ayant aucun point de comparaison statistiquement fiable pour décider de la validité de ces chiffres, il a été décidé d'écarter cet animal des phases d'interprétation des divers résultats, une forte influence individuelle ne pouvant être écartée. Par contre pour les deux autres animaux, BS 406 et BS 392, leur évolution pondérale est restée plus classique avec une perte de poids modérée et régulière commençant peu après l'infection et persistant durant les deux mois. On savait déjà qu'en début de maladie l'amaigrissement des bovins trypanosomés différait peu que les animaux soient sensibles à la maladie ou résistants (résistance innée ou acquise). D'aspect extérieur, aucun animal n'a semblé beaucoup s'amaigrir. Les trois zébus se sont alimentés normalement tout au long de l'expérience ; seul l'animal BS 392 a jeûné pendant deux jours avec des signes d'affaiblissement marqué (difficulté à se déplacer, voir chute sur le sol) un mois après l'infection puis s'est rétabli et réalimenté sans soin particulier. D'une manière générale les trois animaux sont apparus fatigués par la maladie après deux mois d'infection.

Au niveau du laboratoire, le suivi hématologique et parasitaire s'est renforcé.

La recherche des trypanosomes dans le sang a été effectuée une semaine après l'infection. Celle-ci ayant été réalisée par voie intra-veineuse, et non par l'intermédiaire de glossine, la période pré-patente de la maladie a été courte. Au huitième jour post infection, on a pu détecter chez tous les animaux un nombre conséquent de parasites. Pour estimer la parasitémie, on se sert des tubes à hématocrite préalablement utilisés pour l'estimation de la diminution des globules rouges. Dans les tubes centrifugés, on peut repérer différentes couches : successivement du bas vers le haut on trouve les hématies, une bande intermédiaire constituée des leucocytes et des plaquettes, puis le plasma. C'est la deuxième zone qui est la plus intéressante pour cette manipulation, car les trypanosomes s'y trouvent concentrés. Après avoir fragilisé les tubes par une petite entaille du verre



	Poids initiaux (le 19/07/99)	Poids le 08/09/99
BS 390	262 kg	307 kg
BS 392	275 kg	285 kg
BS 406	293 kg	271 kg

à environ un millimètre sous la zone, ils sont cassés de manière nette. On peut alors récupérer les constituants de la bande qui nous intéresse sur une lame. Quelques gouttes sont récupérées sur une lame et homogénéisées par une légère agitation. Une lamelle est déposée sur la préparation qui est immédiatement examinée au microscope. De cette manière, les trypanosomes restent vivants et actifs, et sont plus facilement repérables. La lamelle doit être étudiée sur toute sa surface par un balayage méthodique. Quand la parasitémie est faible, il est nécessaire d'observer environ deux cents champs, dans le cas contraire vingt à quarante champs suffisent. A chaque fois on recense le nombre de trypanosome que l'on a pu voir, et on estime une concentration moyenne de parasites par champ. A l'aide d'une table et en respectant des critères de grossissement (grossissement total multiplié par 250), on peut évaluer le nombre de parasites par millilitre de sang infecté. Ces examens ont été réalisés tous les deux à trois jours à partir du 5 août.

Pendant ma période de présence à l'ILRI, la parasitémie a évolué de manière similaire chez les trois zébus. Elle est restée très élevée les quinze premiers jours, puis s'est mise à fluctuer au rythme des différents serodèmes. Cela correspond avec les enseignements de 1998, à savoir qu'en début d'infection il n'y a pas de différence notable de parasitémie avec le degré de sensibilité des animaux à la trypanosomose ou suivant le type d'immunisation.

La valeur de l'hématocrite des trois animaux a commencé à descendre assez rapidement après l'infection et elle est passée sous la barre des 30 % deux semaines après l'injection du parasite. Elle n'a ensuite cessé de décroître régulièrement pendant deux mois. Lors de l'expérience de 1998, ce paramètre n'avait commencé à remonter, chez les individus immunisés avec de la congopaine, que vers le 90^{ème} jour. Cela coïncide avec ce qui a été observé cette année.

Concernant la formule sanguine dans son ensemble, elle a été suivie à un rythme hebdomadaire. Un frottis sanguin était réalisé une fois par semaine, et lu après coloration rapide, pour évaluer la formule, repérer d'éventuelles anomalies cellulaires et juger de l'évolution des caractères de l'anémie. Un comptage cellulaire à la machine était aussi réalisé le même jour pour affiner et confirmer les observations au microscope. Les résultats n'ont révélé aucune anomalie cellulaire. Les globules blancs, et plus particulièrement les lymphocytes, ont vu leur nombre diminuer de manière importante après quinze jours – trois semaines d'infection. Le taux le plus bas pour le zébu BS 392 correspond à la période où il apparut très affaibli. Le nombre de plaquettes a chuté encore plus rapidement, pour se retrouver divisé à peu près par trois après les deux premiers mois de maladie. Le nombre des hématies a été diminué de moitié pendant la même période, mais de manière plus régulière. L'anémie est restée normochrome et normocytaire avec des signes de régénération nets.

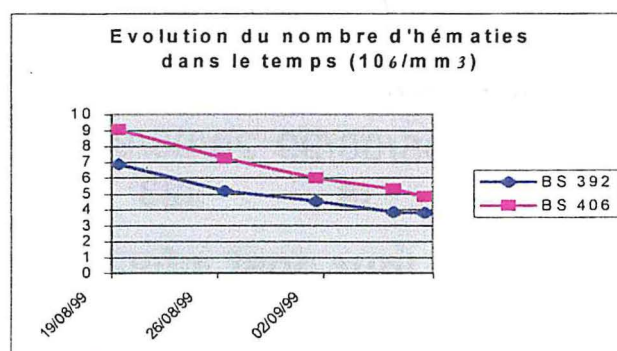
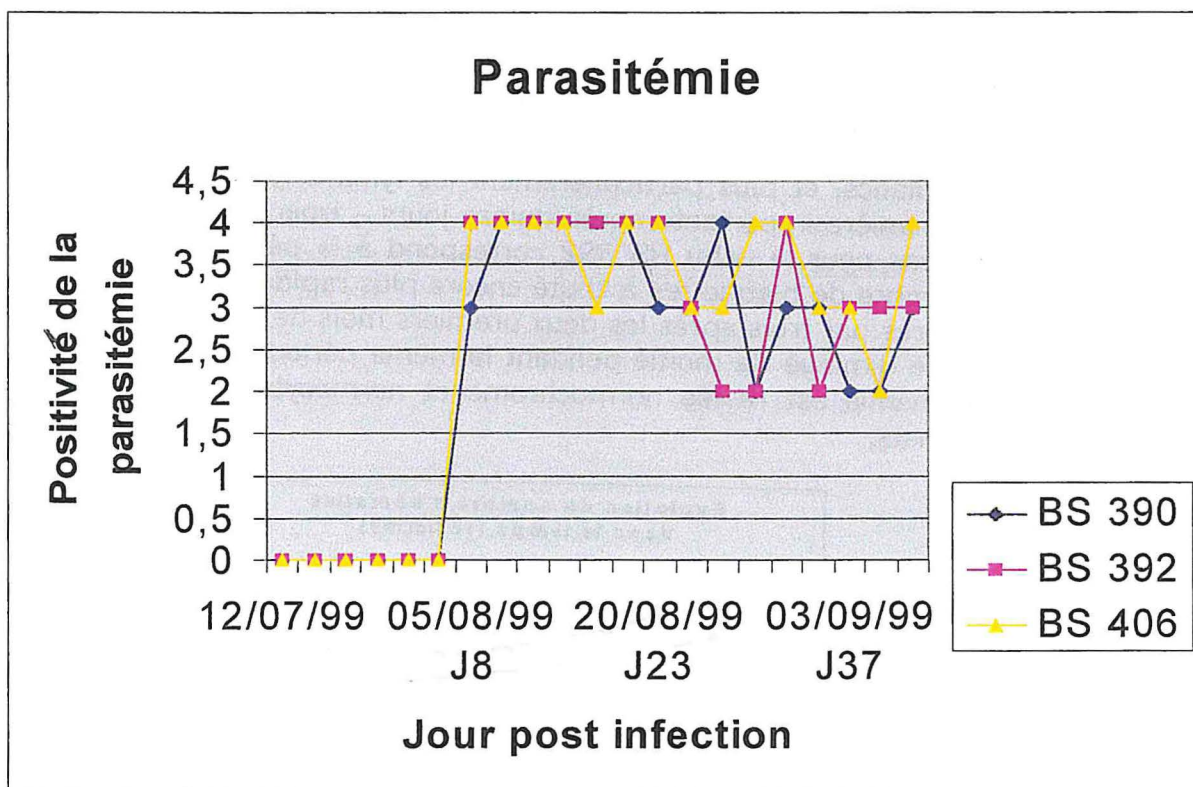


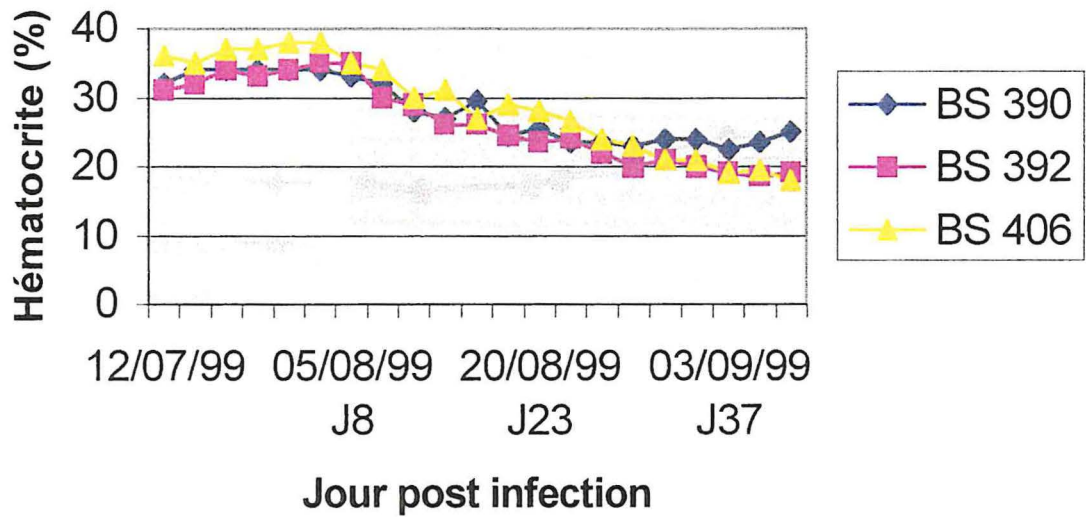
Table servant à l'estimation de la parasitémie

Score	Nombre de trypanosomes par champ (Gx250)	Concentration en trypanosome
6 +	Grouillement de parasites nombre > 100	$> 5 \times 10^6 / \text{ml}$
5 +	>10	$> 5 \times 10^5 / \text{ml}$
4 +	1 à 10	$10^4 \text{ à } 5 \times 10^5 / \text{ml}$
3 +	1\2 champs à 1\10champs	$10^4 / \text{ml}$
2 +	1 à 10 par préparation	$10^3 \text{ à } 10^4 / \text{ml}$
1 +	1 par préparation	$10^2 \text{ à } 10^3 / \text{ml}$

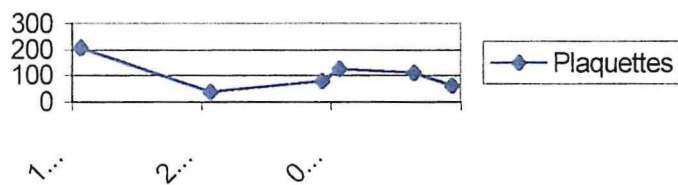
Evolution dans le temps de la parasitémie des trois zébus



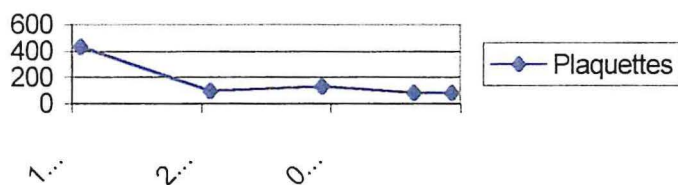
Evolution de l' hématokrite



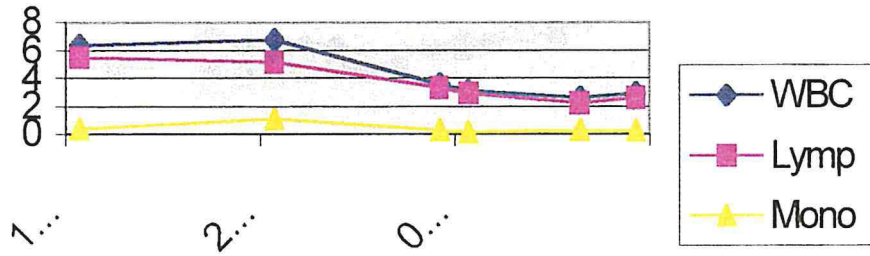
Evolution du nombre de plaquettes de BS 392 ($10^5/mm^3$)



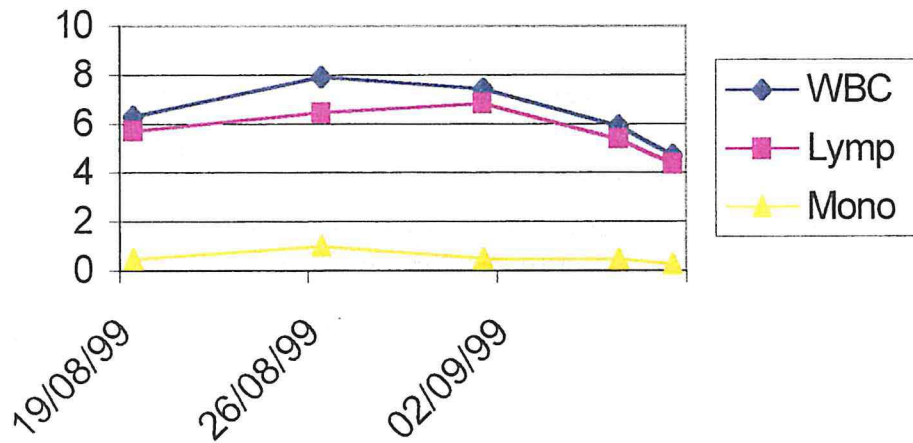
Evolution du nombre de plaquettes de BS 406 ($10^5/mm^3$)



Evolution de la lignée blanche de BS 392 (10³ /mm³)



Evolution de la lignée blanche de BS 406 (10³ /mm³)



Les différents prélèvements ont bien entendu aussi servi à suivre la réponse immunitaire des animaux vis-à-vis de la congopaine. Des tests ELISA similaires à ceux de la phase d'immunisation ont été réalisés mais cette fois sur l'ensemble de l'expérience.

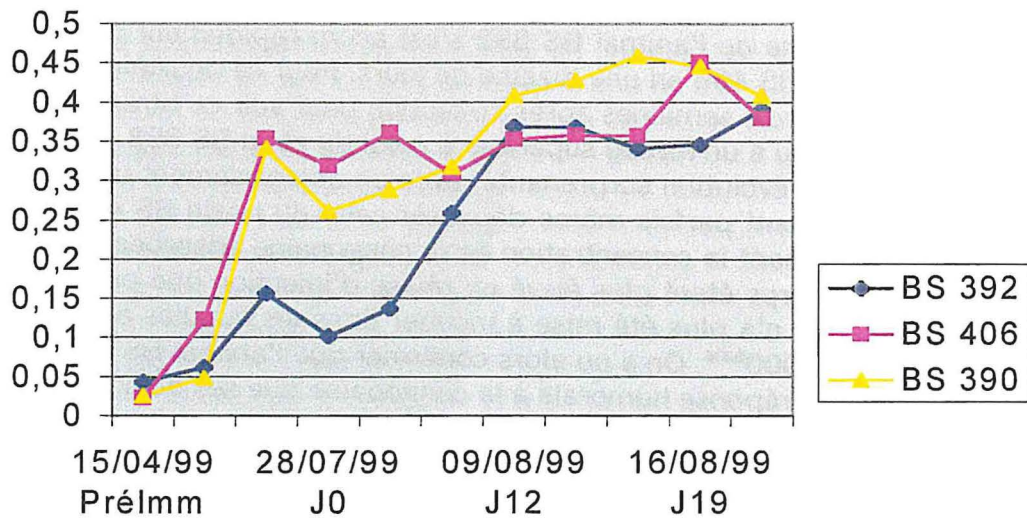
Suite à l'infection expérimentale par *Trypanosoma congolense*, le titrage en anticorps anti-congopaine de l'animal BS 392 s'est accru rapidement pour rejoindre les valeurs du taurillon BS 406 en une dizaine de jours. Pour ce deuxième animal, il a fallu attendre presque trois semaines après l'infection pour voir ce titrage évoluer. Ce taux s'est alors maintenu à un niveau supérieur à celui du zébu BS 392. L'individu BS 390 a eu là encore une évolution surprenante, avec un accroissement marqué de son taux d'anticorps, semblant parfois même dépasser celui du bovin BS 406. Les tests ont été affinés en modifiant la concentration de la congopaine adsorbée sur la plaque ELISA. Le taux d'anticorps étant plus élevé en phase d'infection que précédemment, la protéine antigénique n'a plus été mise à incuber dans les cupules à la dilution de 1/50^{ème} mais au 1/1 000^{ème}. On a pu alors confirmer que l'animal BS 406 avait tout le temps une meilleure réponse humorale à la congopaine que ses deux congénères.

Concernant la réponse vis-à-vis de la protéine recombinante C2, la différence initialement observée entre les individus BS 390 et BS 392 d'une part, et BS 406 d'autre part, s'est vite comblée, en une huitaine de jours. A partir de là, un plateau été atteint pour tous les zébus et ce au moins jusqu'au 42^{ème} jour post infection.

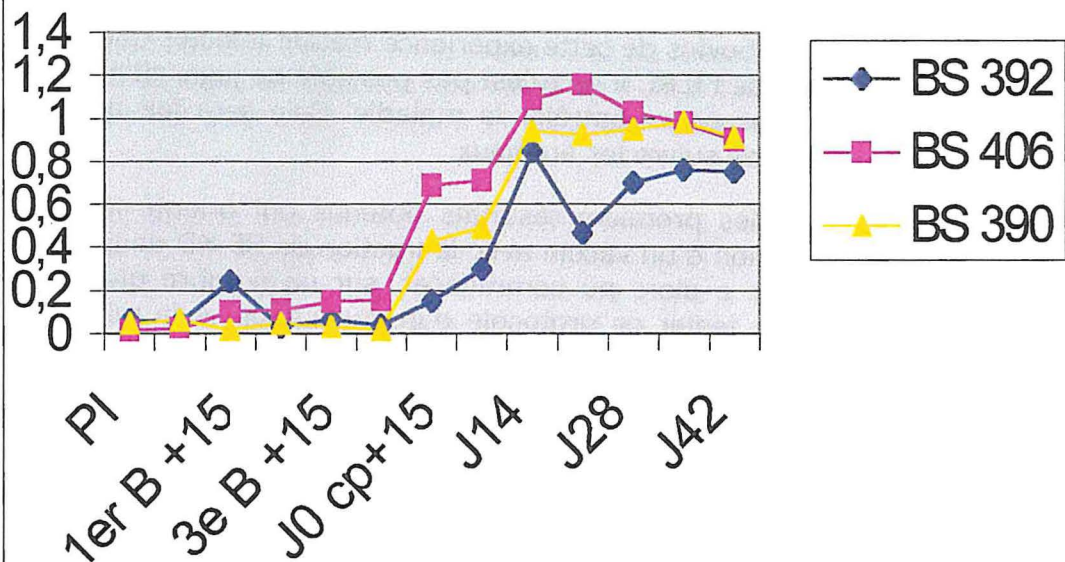
Au final il semble que les meilleures réponses humorales post infection, en terme de rapidité et d'amplitude, soit obtenues lors d'immunisation préalable avec la fraction de 35 KD de la C2. La protéine C3 devra être testée à nouveau sur d'autres zébus pour confirmer les résultats obtenus ici. Concernant l'évolution de la trypanosomose chez les zébus, les expérimentations préalables ont montré qu'un délai de 90 jours environ était nécessaire pour que des différences significatives apparaissent entre les différents groupes d'animaux suivant leur type d'immunisation. Les trois bovins de cette expérience n'étant infectés que depuis deux mois lors de mon départ de l'ILRI, il ne m'est pas possible de juger de l'efficacité des différents types de vaccins pour contrôler la maladie. Cela sera fait ultérieurement par l'équipe qui continue de suivre les animaux.

Quoiqu'il en soit, les premiers résultats obtenus ont orienté les travaux de recherche vers la conception d'un vaccin avec la fraction de 35 KD de la protéine C2. Une deuxième expérience a alors pu commencer, sur un nombre plus conséquent d'animaux, afin de mieux tester ce protocole d'immunisation. A la mi-août dernier, douze bovins de race Boran ont reçu une dose immunisante contenant 50 µg de cette fraction mélangé pour moitié à l'excipient Montanide ISA206. Douze autres animaux Boran ont reçu une dose témoin, composé d'un mélange de cytochrome C de structure voisine à celle de la C2, et de Lac Z obtenu de manière similaire à la C2 (électrophorèse puis électroélution), toujours en association avec le même excipient. Trois rappels étaient prévus à une quinzaine de jours d'écart, suivi d'une infection expérimentale par *Trypanosoma congolense* par l'intermédiaire de glossines. Cette expérience suit son cours et les premiers résultats sont attendus pour l'an prochain, avec l'espoir de bons résultats.

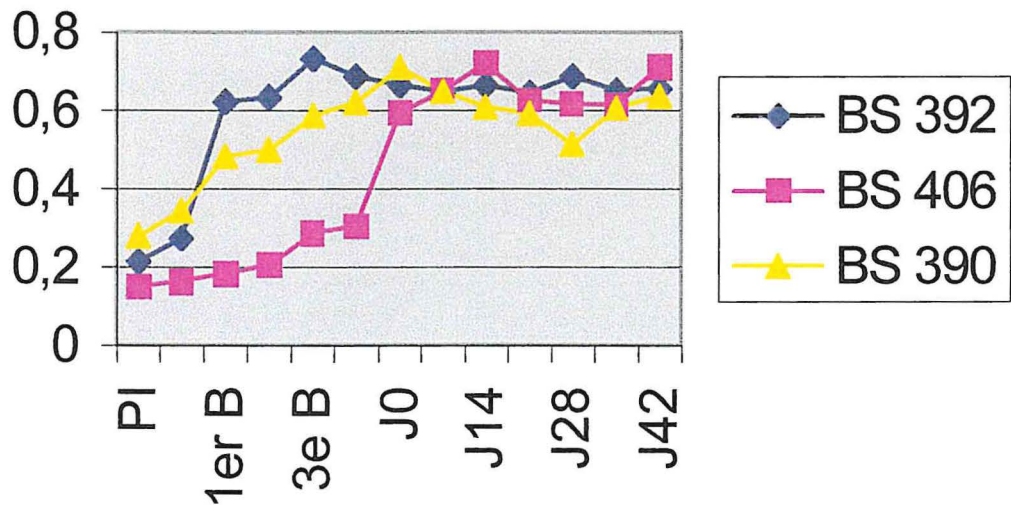
Evolution du titrage en anticorps anti CP (en dO)



Cp au 1/1 000ème (en dO)



C2 (en dO)



Conclusion

Ces nombreux travaux, même s'ils ne sont pas encore tous terminés, semblent bien indiquer que la congopaine joue un rôle important dans les processus pathologiques, tant au niveau de l'anémie que de l'immunosuppression, les deux principales conséquences de la trypanosomose animale. Si les expériences en cours confirment les résultats obtenus antérieurement, c'est-à-dire si les animaux immunisés avec cette cystéine protéase contrôlent mieux leur anémie et présentent une bonne capacité à produire une réponse immunitaire adéquate, cela signifiera qu'il est possible d'induire des caractères de trypanotolérance chez des bovins sensibles ce qui représenterait un espoir certain pour l'amélioration de la production animale en Afrique.

Il est certain que l'immunisation avec de la congopaine n'empêchera pas l'infection, ni le bétail de tomber malade. Cependant cela constitue un premier pas vers l'identification d'un facteur parasitaire impliqué dans la pathologie de l'infection par les trypanosomes. Utilisée seule, la congopaine ne pourra probablement pas prétendre à être un vaccin au sens strict contre la trypanosomose. Par contre, ce type d'immunisation pourra s'avérer très intéressant dans le cadre d'un « vaccin cocktail », c'est-à-dire un vaccin constitué d'un mélange d'antigènes. Les scientifiques de l'ILRI multiplient les domaines de recherche pour lutter contre cette pathologie. Certains continuent de s'intéresser à un vaccin anti-parasite en travaillant par exemple sur des antigènes invariants comme ceux de la poche flagellaire du trypanosome ; d'autres essaient de mettre au point un vaccin capable de bloquer la transmission du parasite de la mouche à son hôte ; d'autres encore cherchent à identifier et contrer de nouvelles toxines parasitaires.

Cette approche moderne de lutte contre les maladies parasitaires, si elle s'avère fructueuse, pourrait s'appliquer à de nombreuses autres parasitoses, tant animales qu'humaines, avec toutes les perspectives d'amélioration de la santé et de la qualité de vie en général que l'on peut imaginer.

BIBLIOGRAPHIE

1. **ABDERRAHMAN M. , RAYON J.**
Biologie moléculaire
Ed Dunod Paris 1999, 159p.
2. **ADAMS T.E. ,BRANDON M.R.**
The bovine major histocompatibility complex and disease resistance.
In The Ruminant Immune System in Health and disease
Ed by W Ivan Morrisson, ILRAD Nairobi Kenya
Cambridge University Press 1986: 178-203.
3. **AMOLE B.O., CLARKSON A.B. Jr, SHEAR H.L.**
Pathogenesis of anemia in *Trypanosoma brucei* infected mice.
Infect Immun 1982 Jun;36(3): 1060-1068.
4. **ASKONAS B.A., BANCROFT G.J.**
Interaction of African trypanosomes with the immune system.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1984 Nov 13;307(1131):41-49.
5. **AUDIGIE C.I., DUPONT G., ZONZAIN F.**
Principes des méthodes d'analyse biochimique tome 1
Coll Biosciences et Techniques, Ed Douin. Paris 1995, 2^{ème} édition, 220p
6. **AUTHIE E., MUTETI D.K., MBAWA Z.R., LONSDALE-ECCLES J.D., WEBSTER P., WELLS C.W.**
Identification of a 33-kilodalton immunodominant antigen of *Trypanosoma congolense* as a cystein protease.
Mol Biochem Parasitol 1992 Nov;56(1):103-116.
7. **AUTHIE E., MUTETI D.K., WILLIAMS D.J.**
Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis.
Parasite Immunol 1993 Mar;15(3):185-211.
8. **AUTHIE E., DUVALLET G., ROBERTSON C. ,WILLIAMS D.J.L.**
Antibody responses to a 33kD cysteine protease of *Trypanosoma congolense* : relationship to « trypanotolérance» in cattle.
Parasite Immunology 1993; 15: 465-474.
9. **AUTHIE E.**
Contribution à l'étude des mécanismes immunologiques impliquées dans la trypanotolérance des taurins d' Afrique.
Thèse pour le Doctorat ès Sciences de la Vie, Biologie-Santé.
Bordeaux (FRA) : Université de Bordeaux II, 1993. 300p.
10. **AUTHIE E.**
Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for congopain?
Parasitology Today 1994;10(9): 360-364.

- 11. BALTZ T., BALTZ D., GIROUD C., PAUTRIZEL R.**
Immune depression and macroglobulinemia in experimental subchronic trypanosomiasis.
Infect Immun 1981 Jun;32(3):979-984.
- 12. BLACK S.J.**
Host responses which control *Trypanosoma brucei* parasites.
In The Ruminant Immune System in Health and disease
Ed by W Ivan Morrisson, ILRAD Nairobi Kenya
Cambridge University Press, 1986 p525-538.
- 13. BIDEAU J., GIDEL R., MOITY J.**
Note préliminaire sur l'étude électrophorétique du sérum de bovins trypanosomés.
Bulletin de la Société de Pathologie Exotique 1966 ; 59 : 817
- 14. BOCQUENTIN R., DUVALLET C.**
Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la detection d'anticorps anti *Trypanosoma congolense* chez les bovines.
Rev Elev Med vet Pays trop 1990;43(2):179-186
- 15. BOREHAM P.F.L.**
Pathogénie des trypanosomes.
In Les moyens de lutte contre les Trypanosomes et leurs vecteurs. Ministère de la coopération, IEMVT. Office international des Epizooties. Actes du Colloque. Paris 12-15 mars 1974, p283-284.
- 16. BOULANGE A., AUTHIE E.**
A 69 kDa immunodominant antigen of *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein (Bip).
Parasitology 1994 Aug;109(Pt2):163-173.
- 17. CHAGAS J., AUTHIE E., SERVEAU C., LALMANACH G., JULIANO L., GAUTHIER F.**
A comparison of the enzymatique properties of the major cysteine proteinases from *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma cruzi*.
Mol. Biochem. Parasitol. 1997; 88:85-94.
- 18. CLAYTON C.E., SACKS D.L., OGILVIE B.M., ASKONAS B.A.**
Membrane fractions of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host.
Parasite Immunol 1979 Autumn ;1(3):241-249.
- 19. COULOMB J., GRUVEL J., MOREL P., PERREAU P., QUEVAL R., TIBAYRENC R.**
La trypanotolérance. Synthèse bibliographique des connaissances actuelles.
Maisons Alfort (Fra) GERDAT-IEMVT 1977. 277p.

- 20. DARGIE J.D.**
 Pathophysiology of trypanosomiasis in the bovine.
In Isotope and Radiation Research on Animals Diseases and their Vectors.
 Proceeding of a Symposium, Vienna, May 1979;121-132.
- 21. DAULOUEDE S, OKOMO-ASSOUMOU M.C., LABASSA M., FOUQUET C., VINCENDEAU P.**
 Mécanismes de défense au cours des trypanosomoses.
 Bull Soc path Ex 1994;87:330-332.
- 22. DELAFOSSE A., BENGALY Z., DUVALLET G.**
 Use of Trypanosoma antigen detection ELISA during an epidemiological follow-up in the Sideradougou, Burkina Faso.
 Rev Elev Med Vet Pays Trop 1996;49(1):32-37
- 23. DONELSON J.E., HILL K.L., EL-SAYED N.M.A.**
 Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes.
 Mol. Biochem. Parasitol. 1998 ; 91 :51-66
- 24. DUVALLET G.**
 Trypanosomoses humaine et animale en Afrique de l'Ouest. Recherches épidémiologiques et immunoparasitologiques.
 Thèse pour le Doctorat de l'Université d'Orsay 1987; 219p.
- 25. DUVALLET G. SAMA MOSSILO H.**
 Trypanosomose expérimentale à *Trypanosoma brucei brucei* chez les bovins domestiques. Variation antigénique et trypanotolérance.
 Acta Tropica 1987,44 :29-33.
- 26. FAKAE B.B., CHIEJINA S.N.**
 The prevalence of concurrent trypanosome and gastrointestinal nematode infections in west African dwarf sheep and goats in Nsukka area of eastern Nigeria.
 Vet Parasitol 1993 Sep;49(2-4):313-318.
- 27. FLYNN J.N., SILEGHEM M.**
 Immunosuppression in trypanotolerant N'Dama cattle following *Trypanosoma congolense* infection.
 Parasit Immunol 1993 Sep;15(9):547-552.
- 28. FOUGEREAU M.**
 Eléments d'immunologie fondamentale.
 In Biologie maîtrise, Masson et Cie éditeurs, 1975.192p.
- 29. GAZZINELLI R.T., GALVAO L.M., KRAUTZ G., LIMA P.C., CANCADO J.R., SCHARFSTEIN J., KRETTI A.U.**
 Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GR57/51) or trypomastigote shed antigens to asses cure for human Chaga's disease.
 Am J Trop Med Hyg 1993 Nov;49(5):625-635.

- 30. GOOSSENS B., OSAER S., KORA S .**
 Long term effects of an experimental infection with *Trypanosoma congolense* on reproductive performance of trypanotolerant Djallonke ewes and West African dwarf does.
 Res Vet Sci 1997 Sep-Oct;63(2):169-173.
- 31. GOOSSENS B., OSAER S., KORA S. , NDAO M.**
 Haematological changes and antibody response in trypanotolerant sheep and goats following experimental *Trypanosoma congolense* infection.
 Vet Parasitol 1998 Nov 27;79(4):283-297.
- 32. HUNKAPILLER M.W., LUJAN E., OSTRANDER F. et HOOD L.E.**
 Isolation de microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino-acid sequence analysis.
 Méthodes Enzymol 1983; 91:227-236
- 33. IKEDE B.O.**
 Pathogenic mechanisms in african trypanosomiasis.
 In International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control. Fourteenth Meeting. Dakar, Sénégal, 1975. P 157-162.
- 34. KATUNGA- RWAKISHAYA E.**
 Influence of *Trypanosoma congolense* infection on some blood inorganic and protein constituents in sheep.
 Revue Elev. Méd. Vét. Pays trop.,1996,49(4):311-314.
- 35. LONSDALE- ECCLES J.D. et MPIMBAZA G.W.N.**
 Thiol-dependent proteases of African trypanosomes. Analysis by electrophoresis in sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gels co-polymerized with fibrinogen.
 Eur. J. Biochem 1986; 155: 469-473
- 36. LUCKINS A.G.**
 Detection of antibodies in the trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay.
 Trop. Anim. Health Prod. 1977; 9: 53-62
- 37. MC LAUGHLIN J.**
 Trypanosoma rhodesiense: antigenicity and immunogenicity of flagellar pocket membrane components.
 Exp. Parasitol. 1987; 64:1-11.
- 38. MANSFIELD J.M.**
 Immunology of African Trypanosomiasis
In: Modern Parasite Biology: Cellular Immunology and Molecular Aspect. DJ Wyler
 Ed by Freeman §Co, New York 1990, p222-246.

- 39. MBAWA Z.R., GUMM I.D., SHAW E., LONSDALE-ECCLES J.D.**
 Characterisation of a cysteine protease from bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*.
 Eur. J. Biochem. 1992; 204:371-379.
- 40. MKUNZA F., OLAHO W.M., POWELL C.N.**
 Partial protection against natural trypanosomiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from *Trypanosoma brucei rhodesiense*.
 Vaccine 1995 Feb;13(2):151-154.
- 41. MOTTRAM J.C., BROOKS D.R., COOMBS G.H.**
 Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and Leishmania in host-parasite interactions.
 Curr. Opin. Microbiol. 1998; 1:455-460.
- 42. MRAMBA NYINDO.**
 Animal diseases due to protozoa and rickettsia.
 Printed by English Press, PO. Box 30127 Nairobi Kenya, 141p.
- 43. MURRAY M.**
 The pathology of African trypanosomiasis.
In International Scientific Council for Trypanosomiasis Research and Control. Fourteenth Meeting. Dakar, Sénégal, 1975. p 141-147.
- 44. MURRAY M., MURRAY P.K., MAC INTYRE W.I.M.**
 An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis.
 Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 1977; 71:325-326
- 45. MURRAY M., MORRISON W.I., EMERY D.L., AKOL G.W.O., MASAKE R.A., MOLOO S.K.**
 Pathogenesis of trypanosome infection in cattle.
In Isotope and Radiation Research on Animal Diseases and their Vectors. Proceeding of a Symposium, Vienne, mai 1979; p15-30
- 46. MURRAY M., DEXTER T.M.**
 Anaemia in bovine African trypanosomiasis.
 Acta Trop. 1988; 45: 389-432
- 47. MWANGI D.M., MUNYUA W.K., NYAGA P.N.**
 Immunosuppression in caprine trypanosomiasis : effects of acute *Trypanosoma congolense* infection on antibody response to anthrax spore vaccine.
 Trop Anim Health Prod 1990 May;22(2):95-100.
- 48. NANTULYA V.M., MUSOKE A.J., RURANGIRWA F.R., BARBET A.F., NGAIRA J.M., KATENDE J.M.**
 Immune depression in African trypanosomiasis : the role of antigenic competition.
 Clin Exp Immunol 1982 Feb;47(2):234-242

- 49. NORTH M.J., MOTTRAM J.C., COOMBS G.H.**
Cysteine proteases of parasitic Protozoa.
Parasitology Today 1990; 6:270-275.
- 50. OSAER S., GOOSSENS B., JEFFCOATE I., KORA S., HOLMES P.**
Effects of *Trypanosoma congolense* and nutritional supplements on establishment and outcome of pregnancy in trypanotolerant Djallonke ewes.
Anim Reprod Sci 1998 Apr 30;51(2):97-109.
- 51. OSAER S., GOOSSENS B., KORA S., JEFFCOATE I.**
Effects of *Trypanosoma congolense* infection and diet on puberty, age at first lambing and haematology changes in Djallonke ewe lambs.
Vet Parasitol 1999 Jan 14;80(3):215-230.
- 52. PALING R.W., MOLOO S.K., SCOTT J.R., GETTINBY G., MC ODIMBA F.A., MURRAY M.**
Susceptibility of N'Dama and Boran cattle to sequential challenges with tsetse-transmitted clones of *Trypanosoma congolense*.
Parasite Immunol. 1991; 13:427-455.
- 53. PARIS J., MURRAY M. et MC ODIMBA F.**
A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of African trypanosomiasis in cattle.
Acta Tropica 1982; 39, 307-316.
- 54. PINDER M., BAUER J., VAN MELICK A., FUMOUX F.**
Immune responses of trypanoresistant and trypanosusceptible cattle after cyclic infection with *Trypanosoma congolense*.
Vet Immunol Immunopathol 1988 Apr;18(3):245-257.
- 55. RURANGIRWA F.R., TABEL H., LOSOS G., MASIGA W.N., MWAMBU P.**
Immunosuppressive effect of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma vivax* on the secondary immune response of cattle to *Mycoplasma mycoides subsp mycoides*.
Res Vet Sci 1978 Nov;25(3):395-407.
- 56. RURANGIRWA F.R., TABEL H., LOSOS G.J., TIZARD I.R.**
Immunosuppression in bovine trypanosomiasis. The establishment of "memory" in cattle infected with *T. congolense* and the effect of post infection serum on in vitro (3H)-thymidine uptake by lymphocytes and leucocyte migration.
Tropenmed Parasitol 1980 Ma;31(1):105-110.
- 57. RURANGIRWA F.R., MUSOKE A.J., NANTULYA V.M., TABEL.**
Immune depression in bovine trypanosomiasis: effects of acute and chronic *Trypanosoma congolense* and chronic *Trypanosoma vivax* infections on antibody response to *Brucella abortus* vaccine.
Parasite Immunol 1983 May;5(3):267-276.

- 58. SACKS D.I., ASKONAS B.A.**
Trypanosome-induced suppression of anti-parasite responses during experimental African trypanosomiasis.
Eur J Immunol 1980 Dec;10(12):971-974.
- 59. TERRY R.J., HUDSON K.M., FAGHIHI SHIRAZI M., MAY D.**
Secondary immunodeficiencies associated with african trypanosomiasis.
In Isotope and Radiation Research on Animals Diseases and their Vectors.
Proceeding of a Symposium, Vienna, May 1979,133-148.
- 60. TIZARD I.R., MELLORS A., NIELSEN K.**
Role of biologically active substances in the pathogenesis and immunology of trypanosomiasis.
In Isotope and Radiation Research on Animals Diseases and their Vectors.
Proceeding of a Symposium, Vienna, May 1979,149-157.
- 61. TOWBIN H., STAEHELIN T. et GORDON J.**
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad Sci. USA 1979; 76: 4350-4354
- 62. UCHE U.E., JONES T.W.**
Protection conferred by *Trypanosoma evansi* against homologous and heterologous trypanosome challenge in rabbits.
Vet Parasitol 1994 Mar;52(1-2):21-35.
- 63. URQUHART G.M.**
Immunosuppression in trypanosomiasis.
In Les moyens de lutte contre les Trypanosomes et leurs vecteurs. Ministère de la coopération, IEMVT. Office international des Epizooties. Actes du Colloque. Paris 12-15 mars 1974,p231.
- 64. VINCEDEAU P., OKOMO-ASSOUMOU M.C., SEMBALLA S., FOUQUET C., DAULOUEDE S.**
Immunologie et immunosuppression de la trypanosomose africaine.
Med Trop (Mars) 1996;56(1):73-78.

Annexes

Les protocoles officiels des deux expériences auxquelles j'ai participé sont fournis ci après.

ILRI EXPERIMENTAL ANIMAL REQUEST FORM

This form is to be submitted to the IACUC after completion and all endorsements.

Title of experiment:

Determination of the most suitable form of C2 for immunisation

IACUC ref #

ILRI Project Area & Cost Code under which experiment falls

A03N Experimental Vaccines

IACUC use only

Objective of experiment:

Please see protocol 98059 for background information about the congopain immunisation/Challenge 1999. Some recent analyses on the recombinant congopain antigens have shown that the recombinant protein actually exists under two forms, a 28 kD form, abundant but poorly recognised by sera of infected N'Dama cattle, and a 35 kD form, possibly glycosylated, highly reactive with sera from infected N'Damas, but less abundant, and more difficult to purify. In addition, another cysteine proteases, called C3, was cloned and expressed; closely related to C2 in term of sequence, and easier to purify, and appeared more abundantly expressed in our system. Hence the dilemma to establish which of the three antigens, 28-kDa, 35-kDa and C3, is the more adequate. The approach we chose was to immunise three cattle, and follow their immune response vis-à-vis native congopain, as well as the in vitro activity-blocking capacity of purified Igs, as well as the immune response and general health of the animal following challenge. Although valuable information is to be gotten from this experiment as far as an adequate form of C2 is chosen for subsequent congopain immunisation/challenge experiment, the main aim of this project is to provide an adequate project to Ms. Micout, veterinarian, and graduate student from Cirad-Emvt..

Work Plan:

Three cattle taken from the pool of the the 98 059 protocol were immunised with the three described antigens. Immune response towards the immunising antigens and towards native CP was followed by ELISA and western blotting, the inhibitory effect of purified Igs on native CP in vitro was analysed by fluorometry. A booster effect is expected during infection, coming from the native CP released by the trypanosomes. Therefore, we plan to infect these animals with bloodstream forms of clone IL1180. Clinical follow-up, parasitaemia, PCV, to be done, as well as anti-CP response, and inhibition of native CP.

Principal investigator (PI): Alain Boulangé

Home Tel #: 631616

Collaborators: Laurence Micout; Tony Musoke

Technicians involved in animal sampling: David Muteti

Animal Requirements:

Species	Breed	Age	Sex	Other
Bovine	Boran	16 months	male	

Number of animals requested: 3 cattle

Number of experimental groups (T1+.....n + C): n/a

Number in each treatment group/control group:

T1

T2

T3

T4

T5

T6

T7

T8

C

TOTAL

Justification for animal numbers:

Three antigens, so three animals

Proposed commencement date: 26/07/99

Duration: 2 months

Method of disposal (select one): Return to Farm

Cross infection/contamination factors: No

If YES, specify:

Is this risky to man? No **Risky to animals?** Yes

Are permits required? No

Minimum standard of holding facility select as applicable : Flyproof/Tickproof

Routine procedures:

Weighing:	yes	Frequency:	weekly
Temperature:		Frequency:	
Feeding:	yes	Frequency:	ad libitum
Watering:	yes	Frequency:	ad libitum

Other procedures:

Frequency:

SOPs

Number	Frequency	Quantity of sample
2d	weekly	5ml
6a	end of exp.	euthatal 25ml

Are there any additional surgical procedures?: no

If yes

Description:

Surgeon:

Signature of PI: A. Boulangé

Date: 9/7/99

Signature of PROL: A.J. Musoke

Date:

Signature of Biometrician
Signature of HOP:

Date:
Date:

Date received by IACUC:

Received by:

IACUC ACTION	
Comments	
Signature	Date

ILRI EXPERIMENTAL ANIMAL REQUEST FORM

This form is to be submitted to the IACUC after completion and all endorsements.

Title of experiment:

Immunisation with recombinant congopain (continuation of IACUC96.T.204 and IACUC97.T.204).

IACUC ref #

IACUC use only

ILRI Project Area & Cost Code under which experiment falls

A03N Experimental Vaccines

Objective of experiment:

To confirm on a statistically significant number of Boran cattle the results of the experiments of 1997 and 1998, i.e. to assess whether immunisation of cattle with a recombinant fragment of congopain confers a degree of resistance to the disease associated with *T. congolense* infection.

The experiment of 1998 (IACUC97.T.204) had shown that during the chronic phase of the disease, some trends of improvement could be observed amongst the congopain-immunised cattle. Congopain-immunised animals remained stable or regained weight, showed a better control of anaemia and leucopaenia, and mounted a better immune response against trypanosome antigens than controls. However, the immunised animals appeared quite heterogenous in terms of responses in the various parameters measured, rendering the statistical analysis difficult due to the small number of cattle in each group (four). Besides, from the different combinations of antigens used, C1, C2, or C1+C2, it appeared that cattle immunised with C2 alone showed the best response and homogeneity. Hence, we propose here to repeat the experiment using a higher number of cattle, immunised with C2.

In addition, combining with observations of the 1998 experiment, we propose to determine whether a correlation exists between the anti-C2 antibody titre (preinfection and during infection) and the state of health (PCV, weight gain) of individual animals

Work Plan:

- Naive cattle will be tested for absence of antibody to CP2 and to anaplasma, and will be dewormed.
- Among the chosen 24 animals, two groups, age, weight and sex matched, will be constituted, one being the control group (12 animals), the other the immunised group (12 animals).
- All animals will be immunised with 200 ug of antigen, either recombinant C2, or unrelated antigen expressed in baculovirus system (controls), followed by two or three identical boosters, until reaching an anti-C2 titer of at least 10. 6.
- All cattle would then be challenged via eight tsetse flies bites per animal using *T. congolense* clone IL-1180
- Parasitaemia and haematological parameters (PCV) will be monitored twice a week during the acute phase of the infection (first two months), then once a week until completion of experiment (fifth month of infection).
- Immune responses against chosen trypanosome antigens will be monitored by ELISA and western blots throughout the experiment at chosen dates.

Principal investigator (PI): Alain Boulangé

Home Tel #: -

Collaborators: Edith Authié

Technicians involved in animal sampling: David Muteti

Animal Requirements:

Species	Breed	Age	Sex	Other
Bovine	Boran	12 months	12 male, 12 female	

Number of animals requested: 24 cattle

Number of experimental groups (T1+.....n + C): 2

Number in each treatment group/control group:

T1	12
T2	
T3	
T4	
T5	
T6	
T7	
T8	
C	12
TOTAL	24

Justification for animal numbers:

It is considered that 12 animals will be needed in each group in view of the variation in response, particularly in relation to PCV observed in the 1997 and 1998 experiments. These numbers will allow statistical comparisons to be undertaken which can separate responders from non-responders in the immunised group and also allow for a proportion of animals which may fail to complete the experiment. Animals will be assigned at random to the two groups taking into account sex and body weight. The 12 animals in each group will then be assigned at random 6 to a pen where feeding will be ad libitum to minimise competition effects.

Analysis of variance techniques, which may need to take into account the existence of repeated measurements on individual animals, will be applied at different phases of the infection.

Proposed commencement date: 01/11/98 Duration: 9 months

Method of disposal (select one): Return to Farm

Cross infection/contamination factors: No

If YES, specify:

Is this risky to man? No Risky to animals? Yes

Are permits required? No

Minimum standard of holding facility select as applicable : Flyproof/Tickproof

Routine procedures:

Weighing:	yes	Frequency:	weekly
Temperature:		Frequency:	
Feeding:	yes	Frequency:	ad libitum
Watering:	yes	Frequency:	ad libitum

Other procedures: Frequency:

SOPs

Number	Frequency	Quantity of sample
2d	weekly	5ml

6a
7b
12biii

end of exp.
monthly
once

euthatal 25ml
3-5ml
8 bites

Are there any additional surgical procedures?: **no**

If yes

Description:

Surgeon:

Signature of PI:	A. Boulangé	Date:	5/10/98
Signature of PROL:	A.J. Musoke	Date:	19/10/98
Signature of Biometrician	J. Rowlands	Date:	22/10/98
Signature of HOP:		Date:	

Date received by IACUC:

Received by:

IACUC ACTION

Comments

Signature

Date

CIRAD-Dist
UNITÉ BIBLIOTHÈQUE
Baillarguet