

Thèse en cotutelle présentée
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX
ET DE L'UNIVERSITÉ NAZI BONI

École Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
École Doctorale Biologie Appliquée et Modélisations des Systèmes
Biologiques

Microbiologie - Immunologie

Par **Magamba TOUNKARA**

**Étude de nouvelles cibles pour le diagnostic de la trypanosomose
animale africaine**

Expression et purification d'antigènes recombinants de trypanosomes et évaluation
de leur potentiel diagnostique

Identification des antigènes immunoréactifs sécrétés par *T. congolense*

Sous la direction de : Loïc RIVIÈRE
Co-directeur : Adrien Marie-Gaston BELEM

Soutenue publiquement le 05 Juillet 2021

Membres du jury :

M. Brice ROTUREAU	Directeur de Recherche	Institut Pasteur Paris	Rapporteur
Mme. Veerle LEJON	Directrice de Recherche	UMR InterTryp IRD	Rapporteuse
M. Nicolas LARMONIER	Professeur	Université de Bordeaux	Président
M. David BERTHIER	Directeur de Recherche	Cirad Montpellier	Invité
M. Loïc RIVIÈRE	Maître de conférences	Université de Bordeaux	Directeur
M. Adrien BELEM	Professeur	Université Nazi Boni	Invité

Étude de nouvelles cibles pour le diagnostic de la trypanosomose animale africaine

Résumé : *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei* sont les agents responsables d'une maladie dévastatrice du bétail, appelée trypanosomose animale africaine (TAA) ou *nagana*, qui touche 38 pays africains de la région subsaharienne. En absence du vaccin, le contrôle de la maladie repose sur la lutte anti-vectorielle, la chimiothérapie et le diagnostic actif, une étape indispensable à la mise en place des traitements appropriés et au suivi. Le diagnostic sérologique, bien qu'applicable sur le terrain selon le format du test, rencontre toutefois des limitations. Il manque de standardisation des antigènes, de sensibilité et de spécificité avec des tests de diagnostic rapide (TDR) souvent peu accessibles. Les objectifs de cette thèse étaient de : (i) caractériser le potentiel diagnostique de protéines identifiées et étudiées dans les laboratoires d'accueils, (ii) sélectionner à partir des données « omiques », de nouvelles cibles et évaluer leur potentiel diagnostique individuel et en combinaison ; et (iii) identifier les protéines immunogéniques à partir d'analyse protéomique et immuno-informatique du sécrétome de trypanosomes. L'exploration du potentiel diagnostique de protéines candidates a été réalisée, après leur expression et leur purification, par ELISA indirect avec des sérums de bovins issus d'infections expérimentales et des sérums issus de bovins infectés naturellement par les trypanosomes. Testées individuellement, les protéines ont montré une faible sensibilité. Cependant, la combinaison des protéines d'immuno-réactivité équivalente a permis d'augmenter significativement la sensibilité des tests avec une spécificité qui reste satisfaisante. Ces résultats constituent une preuve de concept, de la performance des combinaisons de protéines dans le diagnostic de la TAA. Il offre la possibilité d'explorer de nouvelles approches innovantes, notamment l'association de peptides immunogéniques de différentes protéines immunoréactives sous forme de chimères pour le diagnostic sérologique. D'autre part, et au regard de leur performance, aucune des protéines nouvellement testées ne pourra être incluse de manière individuelle dans un TDR. Pour trouver des candidats adaptés, nous avons identifié des protéines sécrétées/excrétées de trypanosomes par spectrométrie de masse. Grâce à une analyse de prédiction d'épitopes, nous avons identifié une centaine de protéines putativement immunogéniques présentant plusieurs épitopes dans

leurs séquences. L'analyse de la réactivité des sérums provenant de différentes races bovines avec le sécrétome de trypanosomes a permis de détecter des protéines fortement reconnues par les anticorps des sérums utilisés et correspondant principalement à quatre tailles moléculaires. À ces tailles, un grand nombre de protéines caractérisées *in silico* comme immunogéniques avaient été détectées. Ces données fournissent une base de sélection fiable des nouvelles protéines à inclure dans les tests sérologiques de la TAA. Elles permettent également de mieux comprendre les différences de réponses humorales de races bovines présentant une susceptibilité différente aux trypanosomoses.

Mots clés : trypanosomose animale africaine, trypanosomes, serodiagnostic, protéines recombinantes, combinaison d'antigènes, protéomique et immuno-informatique.

Study of new diagnostic targets for African animal trypanosomosis

Abstract : *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, and *T. brucei brucei* are the causative agents of a devastating disease of livestock, known as African animal trypanosomiasis (AAT) or nagana, occurring in 38 African countries in the sub-Saharan region. Without a vaccine, the control of the disease relies on vector control, chemotherapy, and active diagnosis, which is essential for appropriate treatment and follow-up. Serological diagnosis, although applicable in the field according to the test format, has limitations. It lacks antigen standardization, sensitivity and specificity, with rapid diagnostic tests (RDTs) being often inaccessible. The aims of this thesis were to : (i) characterize the diagnostic potential of proteins identified and studied in the host laboratories, (ii) select, from "omics" data, new targets and evaluate their diagnostic potential individually and in combination, and, (iii) identify immunogenic proteins from proteomic and immunoinformatic analysis of the trypanosome secretome. Diagnostic potential of candidate proteins was explored, after their expression and purification, by indirect ELISA with bovine sera from experimental infections and sera from cattle naturally infected by trypanosomes. Individually, the proteins showed low sensitivity. However, combining proteins of equivalent immunoreactivity significantly increased the sensitivity of the tests with a specificity that remained satisfactory. These results constitute a proof of concept of the performance of protein combinations in the diagnosis of AAT. It provides an opportunity to explore new innovative approaches, including the combination of immunogenic peptides of different immunoreactive proteins in the form of chimeras for serological diagnosis. Furthermore, and in consideration of their performance, none of the newly tested proteins could be included individually in an RDT. To find appropriate candidates, we identified trypanosome secreted/excreted proteins by mass spectrometry. Using epitope prediction analysis, we identified approximately 100 putatively immunogenic proteins with multiple epitopes in their sequences. The reactivity analysis of sera from different bovine breeds with the trypanosome secretome showed that the proteins were strongly recognized by the antibodies of the sera used and corresponded mainly to four molecular sizes. At these sizes, a significant number of proteins characterized *in silico* as immunogenic were detected. These results provide a reliable data for selection of new proteins to be include in serological tests for AAT.

They also provide a better understanding of the differences in humoral responses of cattle breeds with different susceptibility to trypanosomosis.

Keywords : African animal trypanosomose, trypanosomes, serodiagnosis, recombinant proteins, antigens combination, proteomics and immuno-informatics.

UMR 5234-MFP (Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité).

Université de Bordeaux. 146 Rue Léo Saignat 33046 Bordeaux.

&

Unité de recherche « Maladies à Vecteurs et Biodiversité.

Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
(CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

*« Le succès n'est que l'expression d'une infime partie de l'abondance universelle et divine.
Il est en chacun de nous mais ne s'obtient et ne s'exprime que si l'on adopte une attitude
juste et positive. »*

M. TOUNKARA

Dédicaces

Je dédie ce travail à mes parents et à la grande famille TOUNKARA.

Remerciements

Je serai ingrat de terminer cette thèse sans adresser mes sincères remerciements à tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce projet. Réaliser une thèse en cotutelle n'est pas une chose évidente. Parvenir au bout de ce chemin est une belle occasion pour moi d'exprimer ma profonde gratitude à l'égard de toutes les personnes qui m'ont aidé de quelque manière que ce soit.

Je tiens à remercier très sincèrement :

– *le Dr Loïc RIVÈRE, mon Directeur de thèse. J'aimerais exprimer au travers de ces phrases toute ma reconnaissance pour m'avoir choisi et accordé de la confiance pour la réalisation de ce projet. Je te remercie pour ta disponibilité, ton encouragement, tes qualités humaines et surtout pour avoir su former une équipe formidable pour mon encadrement. Merci!!!*

– *le Dr Frédéric BRINGAUD pour avoir accepté que ce travail se fasse dans son équipe et pour ses propositions très pertinentes qui ont permis de bonifier ce travail. Je te remercie également pour la prolongation du contrat dont j'ai bénéficié et pour ton accompagnement au niveau administratif tout au long de cette thèse. Merci pour tout Fred.*

– *le Dr David BERTHIER, co-encadreur de thèse au CIRAD Montpellier, pour son accompagnement au niveau administratif, son soutien tout au long de cette thèse, sa disponibilité, et pour la qualité de l'encadrement reçu. Tu n'as pas hésité à un instant, même à distance, à intervenir pour débloquer les situations au Burkina (manque des réactifs, des consommables, transfert de matériels de laboratoire etc.) ou même à venir en Afrique pour mes débuts dans les expérimentations au CIRDES. Je te remercie également de m'avoir initié à la demande de financements et pour les différentes corrections très objectives de mes documents.*

– *la Dr Sophie THÉVENON, co-encadreuse de thèse au CIRAD Montpellier. Merci, Sophie, pour tes encouragements et ta rigueur scientifique, pour les nombreuses relectures de mes documents, pour tes suggestions pertinentes qui m'ont permis d'améliorer la qualité de ces documents, et enfin pour l'aide précieuse apportée lors des analyses statistiques. J'ai appris énormément au cours de nos réunions sur la statistique et je compte bien apprendre davantage. Merci!!!*

– *le Dr Alain BOULANGÉ, co-encadreur de thèse et chercheur du CIRAD affecté au Burkina, pour la qualité de l'encadrement scientifique reçu, son soutien dans les moments de doute que j'ai traversé et pour sa disponibilité. Tu as su me conseiller pour faire de bons choix au niveau des expérimentations. J'ai quelques fois abusé de ta disponibilité avec mes questions parfois très nombreuses. Merci, Alain, pour ton écoute et ta compréhension. J'ai appris beaucoup de tes enseignements sur les parasites.*

Je te remercie également pour l'initiation à la demande de financements et pour les nombreuses corrections de mes documents.

– le Dr Zakaria BENGALY, Directeur scientifique du CIRDES, pour avoir accepté ce projet de collaboration avec le CIRDES, pour la mise à disposition des sérums, et surtout pour sa disponibilité à mon égard. Je vous suis très reconnaissant pour vos conseils et pour m'avoir traité comme un membre de votre famille.

– le Pr Adrien Marie-Gaston BELEM, co-directeur de thèse à l'université Nazi Boni de Bobo-Dioulasso, pour avoir accepté de co-diriger cette thèse, pour sa disponibilité et surtout pour la promptitude à répondre à mes demandes au niveau administratif en dépit de ses occupations scientifiques. Merci Professeur.

Je souhaite également remercier les membres du jury, le Pr Nicolas LARMONIER et les Drs Brice ROTUREAU et Veerle LEJON, pour avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

À Bordeaux, je souhaite exprimer ma reconnaissance

– À toute l'équipe iMET pour leur accueil, leur soutien et leur encouragement. Un grand merci à Magali pour m'avoir formé au début de cette aventure et pour sa contribution à la réalisation d'une partie de ce travail. Je vous remercie Manu et Nico pour vos conseils techniques et votre gentillesse. Merci, Sarah la prêtresse, pour ton humour, ton amitié et ton encouragement. Je remercie aussi Corine (Coco), Oriana, Simone, Erika, Chloé, Yoann et Pauline pour leur gentillesse, leur soutien, et pour les discussions utiles lors des réunions de l'équipe. Je tiens à particulièrement remercier Simone (Dronningen) pour m'avoir aidé avec mon code LATEX. "Tak til dronningen for alt".

– À tous les membres de l'UMR 5234-MFP pour leur accueil, leur aide, et leur soutien, en particulier à Rija de Mada pour son amitié, ses conseils et son encouragement.

– À Jean-William DUPUY, notre collaborateur à la plate-forme Proteome de l'Université de Bordeaux, pour la qualité de l'analyse protéomique.

Au CIRDES, je tiens à remercier vivement :

– les techniciens des laboratoires de sérologie et de parasitologie pour leur accueil et le partage. Je remercie particulièrement Mr Souleymane SYLLA pour m'avoir accueilli lors de mon premier séjour à Bobo-Dioulasso, pour sa disponibilité et pour m'avoir trouvé à chaque circonstance des réactifs pour mes manips. Je remercie également Léopold MILLOGO, Adrien ZOUGRANA, Hassane SAKANDÉ, Maurice KONKOBO et Mohamed BAMBA pour le partage et leur soutien technique.

– les stagiaires et amis de la salle 120. Merci, Charlie, pour ton amitié, ta bonne humeur, ton soutien, le partage, et surtout pour tes qualités humaines rares. Merci également à mon ami Babacar depuis Dakar, je n'oublierai pas nos fêtes improvisées et ta philo-

sophie cartésienne. Merci pour tes conseils. Enfin, je remercie le Dr Sib OLLO (mon Koro) pour ses conseils, Eustache pour son humour et tous ceux qui ont contribué à rendre mes séjours inoubliables à Bobo-Dioulasso.

Côté financier,

– je suis reconnaissant au programme de doctorat sud du LabEx ParaFrap pour son soutien financier et pour l'organisation des ateliers remarquables qui m'ont permis de m'épanouir tant sur le plan scientifique que personnel. Merci de m'avoir fait découvrir ce réseau fantastique de parasitologistes. Je remercie également le Pr Patrick Bastien (responsable du programme de doctorat) pour son soutien et ses encouragements. Vous nous avez appris énormément de choses.

– Je remercie également le CIRAD pour m'avoir accordé deux années de suite, des financements d'aide au doctorant, qui m'ont permis de participer à une conférence internationale au cours de laquelle j'ai reçu une reconnaissance scientifique, et de financer la publication d'un de mes articles.

– Je n'oublie pas l'IRD qui a parfaitement accompli sa mission pour les différents voyages que j'ai eu à effectuer entre la France et le Burkina. Merci pour votre professionnalisme.

– Enfin, je voudrais renouveler ma reconnaissance au LAMIVECT (Laboratoire mixte international des maladies à vecteurs) pour m'avoir attribué un micro-financement dans le cadre de la seconde étude cette thèse au Burkina Faso.

Pour terminer, j'adresse ma profonde gratitude à toute ma famille pour leur patience et leur soutien infaillible et constant. Je remercie tout particulièrement mon cousin Cheickné TRAORE pour son encouragement durant toutes ces années que j'ai passées à l'université. Je remercie tous mes amis particulièrement Souleymane (l'entrepreneur), Moussa (le financier), les 2 Modibo (le marketeur et l'informaticien), le Dr Bachirou KONÉ (immunologiste) etc. Merci également au Professeur Abdramane DIALLO (depuis Bamako) de m'avoir poussé à quitter le cocon familial et à entreprendre des études universitaires à l'étranger à commencer par le Maroc. « Choukrane » aux amis du Maroc et merci à tous ceux qui m'ont aidé dans ma scolarité.

Table des matières

Résumé	ii
Remerciements	viii
Table des figures	xvii
Liste des tableaux	xix
Abréviations	xx
I Introduction	1
II Revue bibliographique	6
1 Les trypanosomes	7
1.1 Définition et découverte du parasite	7
1.2 La classification	8
1.2.1 Taxonomie	8
1.2.2 Les trypanosomes d'intérêt médical et vétérinaire en Afrique . .	9
1.2.2.1 Les trypanosomes pathogènes pour l'homme	10
1.2.2.2 Les trypanosomes pathogènes pour les animaux	11
1.3 Morphologie et structure	14
1.4 Biologie des trypanosomes	17
1.4.1 Mode de multiplication	17
1.4.2 Le cycle parasitaire	18
1.4.2.1 Chez la mouche tsé-tsé	20
1.4.2.2 Chez l'hôte mammifère	22
1.4.3 La variation antigénique	23
1.4.4 Organisation du génome des trypanosomes	25
1.4.4.1 Le Génome nucléaire	25

1.4.4.2	Le Génome mitochondrial ou kinétoplastique	26
1.4.4.2.1	Les minicercles	26
1.4.4.2.2	Les maxicercles	27
1.5	Les vecteurs de trypanosomes	27
1.5.1	Les vecteurs cycliques : glossines	27
1.5.2	Les vecteurs mécaniques : Tabanidés et Stomoxyinés	31
1.5.2.1	Tabanidés (taons)	32
1.5.2.2	Stomoxyinés	33
1.6	Les trypanosomoses animales africaines	33
1.6.1	Pathogénie	33
1.6.2	Le concept de trypanotolérance	36
1.6.2.1	Généralités sur la trypanotolérance	36
1.6.2.2	La biologie de la trypanotolérance	37
1.6.3	Les signes cliniques	39
1.6.4	Épidémiologie	40
1.6.5	Importance socio-économique	40
2	Stratégies de lutte et méthodes de diagnostic de la trypanosomose ani-	
	male africaine	42
2.1	Méthodes de lutte contre les trypanosomoses animales	42
2.1.1	L'approche vaccinale	42
2.1.2	Chimioprophylaxie et chimiothérapie	46
2.1.3	Élevage d'animaux trypanotolérants	48
2.1.4	Lutte antivectorielle	49
2.2	Méthodes de diagnostic	50
2.2.1	Diagnostic clinique	51
2.2.2	Examens parasitologiques	51
2.2.2.1	Examens microscopiques directs	52
2.2.2.2	Examens microscopiques après concentration parasitaire	53
2.2.2.3	Techniques de culture des parasites	54
2.2.3	Diagnostic moléculaire	54
2.2.3.1	Détection d'ADN par des sondes	55
2.2.3.2	Amplification d'ADN par PCR	55
2.2.3.3	Amplification d'ARN	57
2.2.3.4	LAMP (amplification iso-thermale)	58
2.2.4	Immuno-diagnostic	62
2.2.4.1	Les tests sérologiques (détection d'anticorps)	62

2.2.4.1.1	Le test d'agglutination : CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis)	62
2.2.4.1.2	Le test de trypanolyse immunitaire (TI)	64
2.2.4.1.3	Le test de fixation du complément : le CFT (Complement Fixation Test)	65
2.2.4.1.4	Le test d'immunofluorescence IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test)	66
2.2.4.1.5	Le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	67
2.2.4.2	Détection d'antigènes	69
2.2.4.3	Les tests de diagnostic rapide disponibles	70
2.2.5	Article	72
3	Les antigènes de trypanosomes africains : marqueurs de diagnostic	73
3.1	Les antigènes invariants de trypanosomes	73
3.2	Les facteurs pathogènes de trypanosomes	78
3.3	Les différentes approches d'identification des antigènes de trypanosomes	79
3.3.1	Immunocriblage de banques d'expression	79
3.3.2	Approche immunoprotéomique	80
3.3.3	Immunoprécipitation couplée à la protéomique	81
3.3.4	Protéomique couplée à l'immuno-informatique	82
III	Projet de recherche	85
4	Les objectifs de la thèse	86
5	Matériels et Méthodes	88
5.1	Matériels biologique	88
5.1.1	Espèces et souches de trypanosomes	88
5.1.1.1	Milieus de culture	88
5.1.1.2	Mise en culture et entretien de <i>T. brucei brucei</i> et de <i>T. congolense</i>	89
5.1.2	Souches de bactéries	90
5.1.2.1	Souches et culture	90
5.1.2.2	Transformation de bactéries par les plasmides recombinants	90
5.1.3	Les vecteurs d'expression et de clonage	91
5.1.4	Les oligonucléotides synthétiques	91

5.1.5	Origines des échantillons de sérums	93
5.1.6	Les antigènes de références	95
5.1.7	Les anticorps primaires et secondaires (conjugués)	96
5.2	Méthodes	97
5.2.1	Techniques de biologie moléculaire	97
5.2.1.1	Extraction et purification de l'ADN	97
5.2.1.1.1	ADN génomique des trypanosomes	97
5.2.1.1.2	ADN plasmidique bactérien	97
5.2.1.1.3	Purification des produits de PCR ou de diges- tion enzymatique	98
5.2.1.1.4	Quantification d'ADN	98
5.2.1.2	Polymerase Chain Reaction (PCR)	98
5.2.1.3	Électrophorèse sur gel d'agarose	99
5.2.1.4	Clonage de gènes pour expression en système bactérien	99
5.2.1.5	Séquençage de fragments d'ADN	100
5.2.2	Techniques biochimiques	102
5.2.2.1	Expression et purification de protéines recombinantes .	102
5.2.2.1.1	Expression des protéines recombinantes . . .	102
5.2.2.1.2	Purification des protéines solubles	102
5.2.2.1.3	Purification des protéines insolubles	104
5.2.2.1.4	Dialyse de protéines	104
5.2.2.2	SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	105
5.2.2.3	Préparation du bleu de Coomassie et coloration de pro- téines	105
5.2.2.4	Quantification de protéines	106
5.2.2.5	Enrichissement de sérums en immunoglobulines	106
5.2.3	Techniques d'immuno-détection	106
5.2.3.1	Préparation des extraits protéiques totaux pour le wes- tern blot	106
5.2.3.2	Préparation du sécrétome de <i>T. congolense</i> pour immu- noblotting	107
5.2.3.3	Western blotting	107
5.2.3.4	Immunoblotting sur bandelettes	108
5.2.3.5	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	109
5.2.4	Spectrométrie de masse	109
5.2.5	Statistiques et analyse des données	109

5.2.5.1	Représentations graphiques	109
5.2.5.2	Traitements de données et analyses statistiques	110
5.2.5.2.1	Évaluation du potentiel diagnostique de protéines recombinantes	110
5.2.5.2.2	Réponses anticorps de bovins au sécrétome de <i>T. congolense</i>	110
5.2.6	Outils bioinformatiques	111
6	Nouvelles protéines candidates pour le sérodiagnostic de la trypanosomose animale africaine : Évaluation du potentiel diagnostique de la lysophospholipase et de la glycérol kinase de <i>Trypanosoma brucei</i>	113
6.1	Résumé	113
6.2	Article	115
7	Test de nouveaux candidats à inclure dans une combinaison de protéines recombinantes pour un diagnostic efficace de la trypanosomose animale	147
7.1	Introduction	147
7.2	Matériels et méthodes	149
7.2.1	Matériels	149
7.2.2	Méthodes	149
7.2.2.1	Sélection de protéines candidates	149
7.2.3	Du clonage à l'évaluation du potentiel diagnostique de protéines par ELISA	149
7.3	Résultats	151
7.3.1	Analyse <i>in silico</i> de TvcMDH, de TbgBiP et de TcG3PDH	151
7.3.2	Clonage, expression et purification des protéines	152
7.3.3	Évaluation du potentiel diagnostique de protéines	154
7.4	Discussion	157
8	Identification des nouvelles protéines immunoréactives dans le sécrétome de <i>T. congolense</i> : stratégie combinée de spectrométrie de masse, d'analyse d'immunodétection et immuno-informatique	162
8.1	Introduction	162
8.2	Matériels et Méthodes	163
8.2.1	Matériels	163
8.2.1.1	Souche et culture de <i>T. congolense</i> IL3000	163
8.2.1.2	Les échantillons de sérums de bovins	164
8.2.2	Méthodes	164
8.2.2.1	Préparation du sécrétome de <i>T. congolense</i> IL3000	164

8.2.2.2	Analyse de la qualité du sécrétome sur gel de polyacrylamide	165
8.2.2.3	Spectrométrie de masse : LC-MS/MS	165
8.2.2.4	Analyse de données protéomique	166
8.2.2.4.1	Bases de données et identification de peptides	166
8.2.2.4.2	Analyse de l'ontologie génétique (GO)	166
8.2.2.4.3	Prédiction des épitopes des cellules B	166
8.2.2.4.4	Sélection de biomarqueurs de diagnostic pour la TAA	166
8.2.2.5	Immublotting sur sécrétome	167
8.2.2.6	Représentations graphiques et analyse statistique	167
8.3	Résultats	168
8.3.1	Qualité de la préparation de sécrétome de <i>T. congolense</i> IL3000	168
8.3.2	Caractérisation de protéines du sécrétome	169
8.3.2.1	Identification et ontologie génique de protéines du sécrétome	169
8.3.2.2	Identification de protéines immunogéniques putatives	169
8.3.3	Réactivité des sérums de différentes races de bovins aux protéines immunoréactives du sécrétome	171
8.4	Discussion et Perspectives	176
IV	Conclusion et perspectives	183
	Références bibliographiques	188
	Annexes	212

Table des figures

1.1	Classification des trypanosomes de mammifères	10
1.2	Ultrastructure de la forme sanguine de <i>T. brucei</i>	15
1.3	Diagramme du cycle de division cellulaire de cellules procycliques de <i>T. brucei</i>	19
1.4	Les étapes du cycle évolutif de <i>T. congolense</i>	20
1.5	Variation du cycle évolutif de trypanosomes africains.	21
1.6	Phénomène de Variation antigénique chez les trypanosomes.	24
1.7	Morphologie d'une glossine.	28
1.8	Distribution des groupes de mouches tsé-tsé <i>Morsitans</i> , <i>Fusca</i> et <i>Palpalis</i> à travers l'Afrique.	29
1.9	Les vecteurs mécaniques de trypanosomes africains.	32
2.1	Structures chimiques des trois principales molécules utilisées en chimiothérapie et chimioprophylaxie de la Trypanosomose animale africaine.	46
2.2	Aspects morphologiques de trypanosomes responsables de la TAA dans un frottis sanguin.	53
2.3	Principe de la LAMP (Loop-Mediated isothermal Amplification).	59
2.4	Mise en œuvre de la LAMP et systèmes de révélations.	60
2.5	Le test CATT/ <i>T. evansi</i> (Card agglutination test for trypanosomosis).	63
2.6	Principe du test de trypanolyse.	64
2.7	Principe du test de fixation du complément (CFT)	65
2.8	Principe du test de détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte ou IFAT.	66
2.9	Principe de l'ELISA indirect et de l'ELISA Sandwich.	68
2.10	Les étapes d'un test ELISA indirect de détection d'anticorps.	68
2.11	Principe d'un test de diagnostic rapide de détection d'antigène.	70
3.1	Principe d'une expérience de spectrométrie de masse en tandem.	82
3.2	Chromatographie d'immuno-affinité et identification d'antigènes à potentiel diagnostic.	83

5.1	Les étapes du clonage par ligation des extrémités cohésives.	101
7.1	Analyse de l'expression et de la solubilité de protéines sur gel SDS-PAGE.	153
7.2	Analyse de la purification de TvcMDH, de TbgBiP et de TcG3PDH par SDS-PAGE.	155
7.3	Évaluation du potentiel diagnostique de protéines par ELISA indirect. .	158
8.1	Profil du sécrétome de <i>T. congolense</i> IL3000 en comparaison avec le lysat total.	168
8.2	Classification en catégories fonctionnelles des protéines identifiées dans le sécrétome de <i>T. congolense</i> IL3000.	170
8.3	Identification des protéines immunogéniques putatives de <i>T. congolense</i> IL3000 comme biomarqueurs pour le diagnostic	172
8.4	Analyse par immunoblotting du profil des réponses anticorps des races bovines au sécrétome de <i>T. congolense</i>	178
8.5	Niveaux de réactivité des sérums de bovins aux protéines du sécrétome de <i>T. congolense</i> IL3000.	179
8.6	Analyse des composantes principales des intensités des bandes de l'immunoblotting.	179

Liste des tableaux

1.1	Caractéristiques des trypanosomoses animales africaines.	34
2.1	Résumé des candidats vaccins rapportés dans la littérature.	44
3.1	Les antigènes majeurs testés en diagnostic sero-immunologique des trypanosomoses animales.	76
5.1	Liste des antibiotiques utilisés	89
5.2	Les vecteurs de clonage et d'expression bactériens.	91
5.3	Liste des oligonucléotides pour clonage, expression et séquençage	92
5.4	Origine des échantillons de sérums testés.	94
5.5	Anticorps primaires et secondaires utilisés.	96
7.1	Les épitopes prédits pour les différentes protéines sélectionnées et les plasmides de clonage.	150
7.2	Pourcentages d'homologie de TvcMDH, de TbgBIP et de TcG3PDH avec leurs homologues et orthologues.	152
8.1	Protéines identifiées avec plus de quatre épitopes dans leurs séquences.	173

Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BCT	Buffy Coat Technique
CATT	Card agglutination test for trypanosomosis
CFT	Complement Fixation Test
DEAE	Diéthylamino-éthyle
ELISA-Ac	ELISA de détection d'anticorps
ELISA-Ag	ELISA de détection d'antigènes
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAO	Food and Agriculture Organization
GO	Gene Ontology
HCT	Haematocrit Centrifugation Technique
HSP	Heat Shock Protein
IEDB	Immune Epitope Database
IFAT	Indirect Fluorescent Antibody Test
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IMDEM	Iscoves Modified Dulbecco's Medium
INF	Interferon
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranoside
ISG	Invariant Surface Glycoprotein
ITS1	Internal Transcribed Spacer 1
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification
LB	Lysogeny Broth
LC-MS/MS	Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry

MEM	Minimum Essential Medium
MTN	Maladies tropicales négligées
NASBA	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
OIE	Organisation mondiale de la santé animale
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open Reading Frame
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCV	Packed Cell Volume
PFR	ParaFlagellar Rod
ROC	Receiver operating characteristic
RT	Room Temperature
Se	Sensibilité
Sp	Spécificité
TAA	Trypanosomose animale africaine
Tbrc	Serum resistance-associated (SRA) gene of <i>T. b. rhodesiense</i>
Tbs-GP	<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> -specific glycoprotein
TDR	Test de diagnostic rapide
TH2	T helper 2
THA	Trypanosomiase humaine africaine
TNF	Tumor Necrosis Factor
VAT	Variable Antigenic Type
VSG	Variant Surface Glycoprotein
WTL	Whole Trypanosoma Lysate
WT	Wild Type

I |> Introduction

Introduction

Les trypanosomoses africaines regroupent deux maladies : la trypanosomiase humaine africaine (THA) et la trypanosomose animale africaine (TAA) ou *Nagana*. Ce sont des maladies à transmission vectorielle et hémoparasitaires constituant une contrainte majeure au développement en Afrique subsaharienne. Elles sont causées par des protozoaires sanguins flagellés communément appelés trypanosomes. Ces parasites sont transmis principalement de manière cyclique aux hôtes (mammifères et reptiles) par un insecte hématophage, la glossine ou mouche tsé-tsé. Alors que le nombre de cas de THA est maintenant faible (quelques milliers de cas) et focalisé dans des petits foyers dits « micro-foyers », la *nagana* reste distribuée sur une superficie de 10 millions de 10 Km² menaçant près de 55 millions de bovins (Desquesnes et al., 2013) dans 38 pays d'Afrique subsaharienne (Itard et al., 2003, Vreysen et al., 2013). La *nagana* est endémique dans les régions où la mouche tsé-tsé est présente. Elle est dévastatrice pour le bétail et constitue une menace sérieuse pour l'élevage et l'agriculture dans les pays affectés à cause de son impact sur la production et la traction animale (Vreysen et al., 2013).

Il est estimé que près de 10 à 30% de bovins à risque de la *nagana* pourraient développer la maladie (Holmes et al., 2004) avec des conséquences physiopathologiques diverses mais généralement graves. La gravité du tableau clinique varie en fonction de la race (phénotype trypanotolérant vs susceptible) et du statut nutritionnel de bovins mais également en fonction des espèces et des souches de trypanosomes (Desquesnes et al., 2013, Taylor and Authié, 2004). La conséquence des manifestations cliniques, notamment une anémie sévère, se traduit par la détérioration de l'état général des animaux, entraînant une réduction notable de la puissance de traction, de la production de viande et de lait (Shaw, 2004), des problèmes d'infertilité associés à des avortements récurrents, et une augmentation de la mortalité (revu dans Gior-

dani et al., 2016, Taylor and Authié, 2004). Les incidences socio-économiques sont majeures et se traduisent par des pertes annuelles estimées à 3 millions de têtes de bovins et à un usage annuel de trypanocides allant jusqu'à 35 millions de doses en Afrique subsaharienne (FAO, 2020). Les pertes économiques qui en découlent dans cette zone, sont estimées à 4,75 milliards de dollars américains par an (Kristjanson et al., 1999) avec plus d'un milliard pour la seule production bovine (FAO, 2020).

La TAA a donc un poids économique important et constitue une réelle contrainte au développement. Plusieurs stratégies de contrôle de la maladie ont été développées dont l'approche vaccinale, l'élevage des animaux trypanotolérants et la lutte contre l'insecte vecteur et la chimiothérapie et la chimioprophylaxie (Vreysen et al., 2013). Du fait de la capacité des trypanosomes à changer régulièrement de manteau glycoprotéique de surface par le biais d'un mécanisme de variation antigénique (revu dans Horn, 2014), le développement de vaccin n'a pas encore été probant pour la TAA et en particulier pour les bovins. Toutefois, il faut noter qu'une étude parue très récemment a montré l'efficacité d'un vaccin anti-*T. vivax* chez la souris (Autheman et al., 2021). La promotion de races animales trypanotolérantes se heurte également au problème du faible gabarit de ces animaux, de leur faible production laitière, et de croisements anarchiques avec des races susceptibles (ou Européennes de plus en plus) réalisés par les éleveurs, ce qui dilue la tolérance. Du côté de la lutte contre le vecteur, les phénomènes de ré-invasion des zones traitées freine les efforts déployés dans la lutte anti-vectorielle. La chimiothérapie systémique avec l'utilisation continue et parfois inadaptée d'un nombre limité de molécules trypanocides est responsable de l'apparition de la chimio-résistance de plusieurs espèces de trypanosomes dans les zones endémiques (Bengaly et al., 2018, Chitanga et al., 2011). Associé à la contrefaçon courante des formulations trypanocides et la toxicité plus ou moins importante de ces molécules, des outils de diagnostic auxiliaires aux décisions de traitement et à la surveillance de la maladie deviennent indispensables.

Le diagnostic de la *nagana* se fait par diverses méthodes (revu dans Büscher et al., 2019, Hailu, 2019, Tounkara et al., 2021). Les différentes techniques employées présentent toutes des avantages et des inconvénients variables. En plus du diagnostic clinique, les parasites peuvent être mis en évidence par le diagnostic parasitologique

(détection directe), par la détection de leurs constituants (ADN et protéines) ou bien par la mise en évidence de la réponse immunitaire de l'hôte (diagnostic sérologique). Comparativement aux autres méthodes, le diagnostic parasitologique est de loin le plus simple à mettre en œuvre mais il manque sérieusement de sensibilité. Les efforts de recherche sur le diagnostic de la TAA se sont focalisés sur le développement des méthodes de diagnostic moléculaire pour les études épidémiologiques : sondes marquées, PCR (Polymerase Chain Reaction) et ses dérivées (PCR-ELISA, qPCR et LAMP). Bien que très sensibles et spécifiques, ces techniques sont inadaptées au diagnostic de terrain du fait de la technologie sophistiquée exigée (revu dans Büscher et al., 2019, Hailu, 2019, Tounkara et al., 2021). Le diagnostic clinique quant-à-lui n'est pas spécifique, et seules les méthodes immunologiques de type test de diagnostic rapide (TDR) sont adaptées au diagnostic de terrain dans un format de test de diagnostic rapide (TDR) (revu dans Tounkara et al., 2021).

Les tests basés sur la détection d'antigènes n'ont pas été probants pour la TAA. La plupart des tests de diagnostic immunologique sont donc basés sur la détection de la réponse anticorps de l'hôte mammifère : CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis), CFT (Complement Fixation Test), TI (Trypanolyse immunitaire), IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test) et ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), qui peut être adaptée en immuno-chromatographie ou test en flux latéral (Boulangé et al., 2017, Büscher et al., 2019). Le test ELISA qui constitue également le « gold standard » des méthodes de diagnostic de la TAA fait toutefois face à un problème de standardisation des antigènes. En effet, les lysats totaux de trypanosomes, dont la production est non harmonisée et éthiquement discutable, restent les antigènes les plus utilisés en matière de séro-diagnostic de la TAA (Desquesnes et al., 2009). Quelques protéines recombinantes ont été évaluées pour être utilisées comme antigène à la fois pour pallier le problème de standardisation et pour améliorer la spécificité de l'ELISA. Citons les HSP70 (Bossard et al., 2010, Boulangé et al., 2002, Kumar et al., 2015), plusieurs cystéines protéases (Boulangé et al., 2017, Eyssen et al., 2018, Pillay et al., 2013), des protéines cryptiques telles que la GM6 (Pillay et al., 2013) et plusieurs glycoprotéines invariantes de surface (Fleming et al., 2014, 2016). Parmi ces protéines testées, seulement trois ont conduit au développement de deux tests TDR. Le premier fut développé en 2014 pour *T. vivax* (Fleming et al., 2016) mais n'a pas encore atteint

le stade commercial. Le second, développé par CEVA, a été commercialisé en 2017 (Boulangé et al., 2017). Ces tests et leurs prototypes en ELISA ont montré des bonnes spécificités. Cependant une sensibilité très faible a été observée, notamment en début d'infection et en phase chronique de la maladie. Par ailleurs, l'accessibilité de ces tests pour les éleveurs reste insuffisante, tant en termes de disponibilité que de coût. Des nouvelles approches et des nouveaux tests réinventant le diagnostic de la TAA et améliorant la sensibilité sont donc nécessaires.

Nous proposons dans ce travail l'évaluation de nouvelles protéines recombinantes comme antigènes pour le sérodiagnostic de la TAA, utilisables dans un test basé sur un antigène unique et/ou en combinaison avec d'autres antigènes. *In fine*, nous avons mené une analyse exhaustive du sécrétome de *T. congolense* pour identifier des protéines à haut potentiel immunogénique dans le but de les inclure dans les prochains tests à développer pour la TAA.

Ce manuscrit est composé de quatre parties : (i) une introduction générale, (ii) une revue de la bibliographie sur la thématique abordée, (iii) une partie expérimentale dans laquelle je présente les objectifs et les travaux menés au cours de cette thèse. Cette partie renferme quatre chapitres numérotés de 4 à 8 comprenant la méthodologie générale pour l'ensemble des études. Enfin, une dernière partie (iv) est consacrée à la conclusion et aux perspectives.

II |> Revue bibliographique

1 | Les trypanosomes

1.1 Définition et découverte du parasite

Les trypanosomes sont des protozoaires unicellulaires, flagellés de l'ordre des *Kinetoplastidae*. Ces sont des parasites obligatoires, généralement dixènes. En effet ils alternent entre un hôte représenté par un insecte dont ils parasitent le tractus digestif et un hôte végétal ou vertébré. Chez ce dernier, ils se développent avec un tropisme dépendant de l'espèce. On distingue les trypanosomes dits africains extra-cellulaires (se développant dans les liquides biologiques et/ou certains organes) et les trypanosomes dits américains qui sont intracellulaires.

La première observation manuscrite d'une affection de trypanosomes africains remonte au Moyen-Âge. Le philosophe et historien arabe Ibn Khaldun a rapporté dans l'un de ses écrits au XIV^e siècle la mort du Sultan de l'empire du Mali, Sultan Mari Diata II, en 1374, avec une symptomatologie faisant référence à la THA. Dans cet écrit le philosophe raconte comme suit : « *Il m'a raconté que Diata a été frappé par la maladie du sommeil, une maladie qui touche fréquemment les habitants de ces régions. Ces malheureux ne sont jamais vraiment éveillés. Les symptômes de la maladie ont persisté deux ans avant que Diata ne meure* » (Ammar, 2013). Ensuite au XVII^e siècle, les explorateurs notamment le chirurgien de la marine anglaise, John Atkins, décrivent les symptômes de la maladie du sommeil parmi des individus réduits en esclavage sur la côte guinéenne. Les pertes humaines occasionnées par la maladie chez ces sujets ont conduit les marchands d'esclaves à entreprendre des travaux scientifiques sur la maladie du sommeil. En 1842, le docteur David Gruby décrit la forme et le déplacement d'un parasite de batraciens. Le terme trypanosome, du grec ancien *trypanon* (tarière) et *soma* (corps), est ainsi apparu (Stephens et al., 1910). Côté animal, le microbiologiste écossais David Bruce a été le premier à établir un lien entre la trypanosomose

et la présence de parasites protozoaires dans le sang, pendant qu'il enquêtait sur la mort de bovins à Zululand, en Afrique du Sud (Brown, 2008). En 1895, David Bruce montre que la maladie chez le bétail, appelée *Nagana* par les Zulus, est transmise par une mouche appelée tsé-tsé, par les populations Matabélé (Motloang et al., 2012). Il a ainsi identifié *Trypanosoma brucei*, parasite ayant hérité de son nom, comme l'agent responsable de la maladie. Après plusieurs travaux menés par différents auteurs et la mise en évidence de la relation entre le parasite, le vecteur et la maladie par David Bruce en 1902 (Steverding, 2008), les espèces de trypanosomes pathogènes ont été identifiées. *T. brucei gambiense* et *T. b. rhodesiense* responsables de la maladie du sommeil, furent identifiés. Dans la période de 1904-1905 c'est au tour de *T. congolense* et de *T. vivax*, pathogènes pour les animaux, d'être découverts (Maudlin et al., 2004, Stevens and Brisse, 2004).

1.2 La classification

1.2.1 Taxonomie

Les trypanosomes sont des protistes (eucaryotes unicellulaires) sanguicoles appartenant à l'ordre des *Kinetoplastida*, à la famille de *Trypanosomatidae* et au genre *Trypanosoma* d'après la classification de 1972 par Hoare (Hoare et al., 1972). Ils se caractérisent par la présence d'un flagelle unique ondulant, d'une mitochondrie unique ramifiée et d'un kinétoplaste contenant de l'ADN en bâtonnet (Uilenberg, 1998). Il existe plus de 36 espèces de trypanosomes parasitant une grande variété d'animaux et même de plantes (Murray et al., 1998). Les espèces infectieuses pour les mammifères ont été divisées en deux groupes selon la partie du système digestif du vecteur dans laquelle elles se développent en forme métacyclique infectante et selon leur mode de transmission à l'hôte vertébré (classification réactualisée par Enyaru et al., 2010) (Enyaru et al., 2010). On distingue ainsi la section de *Stercoraria* et de la section *Salivaria*.

Chez les *Stercoraria*, les trypanosomes ont une évolution dite « postérograde » chez le vecteur. Les trypanosomes infectants se trouvent dans la partie postérieure du tube digestif du vecteur et sont déposés sur la peau et les muqueuses avec les fèces.

La piqûre provoquant une démangeaison importante, le grattage de la zone par l'hôte vertébré provoque une rupture cutanée occasionnant la transmission des parasites. Cette section renferme l'espèce *Trypanosoma cruzi*, responsable de la maladie de Chagas en Amérique Latine.

Les trypanosomes de la section *Salivaria* ont quant-à-eux un développement « antérograde ». À l'exception de *T. equiperdum* qui a une transmission vénérienne, les parasites infectants sont présents dans la partie antérieure du tube digestif du vecteur et sont transmis par inoculation lors de la piqûre qui précède la prise du repas sanguin. La transmission biologique se distingue de la transmission mécanique. Dans la première, les trypanosomes sont transmis après un développement cyclique complet chez le vecteur, la mouche tsé-tsé. Dans la seconde, les trypanosomes sont transmis d'un animal à un autre par un insecte hématophage à l'occasion de repas sanguins interrompus. Les espèces de la section *Salivaria* sont les seules à posséder des gènes de glycoprotéines variantes de surface (Variant Surface Glycoprotein, VSG). Il existe quatre sous-genres appartenant à cette section : *Duttonella*, *Nannomonas*, *Trypanozoon* et *Pycnomonas* (Figure 1.1).

La position systématique des trypanosomes parmi les protozoaires et la classification révisée des trypanosomes de mammifères selon Levine *et al.*, (1980) (Levine *et al.*, 1980) est la suivante :

Sous-règne PROTOZOA

Embranchement SARCOMASTIGOPHORA

Sous-embranchement MASTIGOPHORA

Classe ZOOMASTIGOPHOREA

Ordre KINETOPLASTIDA

Famille TRYPANOSOMATIDAE

Genre *Trypanosoma*

1.2.2 Les trypanosomes d'intérêt médical et vétérinaire en Afrique

Contrairement à la situation en Amérique Latine où l'on retrouve à la fois des espèces pathogènes de trypanosomes de la section *Stercoraria* (exemple de *T. cruzi*) et *Salivaria* (*T. vivax* et *T. evansi*), l'ensemble des espèces de trypanosomes patho-

gènes existants en Afrique sont de la section *Salivaria* (Stevens and Brisse, 2004). Ils sont pour la plupart essentiellement transmis par la mouche tsé-tsé (glossine) qui est leur véritable hôte définitif. Chaque sous-genre renferme au moins une espèce de trypanosome pathogène. Deux sous-espèces de l'espèce *Trypanosoma brucei*, en l'occurrence *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense* appartenant au sous-genre *Trypanozoon*, sont pathogènes pour l'Homme. Chez les animaux, les trypanosomes les plus communs sont ceux des sous-genres *Nannomonas* pour *T. congolense* et *T. simiae*, *Duttonella* pour *T. vivax*, *Trypanozoon* pour *T. brucei*, *T. evansi* et *T. equiperdum* et du sous genre *Pycnomonas* pour *T. suis* (Figure 1.1).

Classe	Zoomastigophorea						
Ordre	Kinetoplastida						
Sous-ordre	Trypanosomatina						
Famille	Trypanosomatidae						
Genre	Trypanosoma						
Sous-genre	Herpetosoma	Megatrypanum	Schizotrypanum	Duttonella	Nannomonas	Trypanozoon	Pycnomonas
Espèces	<i>T. lewisi</i>	<i>T. rangeli</i> <i>T. theileri</i> <i>T. musculi</i>	<i>T. cruzi</i>	<i>T. vivax</i> <i>T. uniforme</i>	<i>T. congolense</i> <i>T. simiae</i> <i>T. godfreyi</i>	<i>T. equiperdum</i> <i>T. evansi</i> <i>T. brucei</i> <i>T. b. brucei</i> <i>T. b. rhodesiense</i> <i>T. b. gambiense</i>	<i>T. suis</i>
Sous-espèces							
Type					<i>T. congolense</i> Savane Forêt Kilifi Tsavo		
Section (mode de transmission)	<i>Stercoraria</i>			<i>Salivaria</i>			

FIGURE 1.1 – Classification des trypanosomes de mammifères

1.2.2.1 Les trypanosomes pathogènes pour l'homme

L'espèce *T. brucei* du sous-genre *Trypanozoon* est subdivisée en trois sous-espèces, *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense* très proches d'un point de vue morphologique et génétique. Elles sont très polymorphes et sont toutes transmises cycliquement par les glossines. Deux des sous-espèces sont pathogènes pour l'homme et causent la trypanosomose humaine africaine (THA) couramment appelée « maladie du sommeil » :

- *T. brucei gambiense* (Dutton, 1902) est l'agent responsable de la forme chronique de la THA. Il sévit en Afrique Occidentale et Centrale et est responsable de plus de 95% de cas de THA. Cette forme de la maladie est anthroponotique (Franco

et al., 2014). Toutefois, des études suggèrent l'existence d'un réservoir animal (Büscher et al., 2018).

- *T. brucei rhodesiense* (Stevens and Brisse, 2004) provoque la THA aiguë considérée comme une maladie anthroponotique en Afrique Orientale et Australe (Franco et al., 2014).

La THA est classée dans la liste des maladies tropicales négligées (MTNs) de l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Ces maladies sont ainsi qualifiées car elles touchent essentiellement des populations pauvres des pays en voie de développement. Ces maladies ne constituent généralement pas une priorité en terme de santé publique et de mise à disposition de fonds dédiés par les pouvoirs politiques en place dans les pays touchés. La THA sévit sous forme épidémique et endémique dans plusieurs pays en Afrique subsaharienne (Simarro et al., 2011). Elle a été ciblée dans la feuille de route de l'OMS dès 2012 qui vise son élimination en 2020 en tant que problème de santé publique et l'arrêt de la transmission à l'homme (zéro cas) à l'horizon 2030. Grâce aux efforts conjugués de surveillance, de lutte anti-vectorielle et aux traitements, la maladie a été confinée à quelques foyers. Le nombre de cas lié à la THA a ainsi été significativement réduit. Il est passé d'environ 7201 cas en 2012 à environ 980 cas en 2019 (WHO, 2020).

1.2.2.2 Les trypanosomes pathogènes pour les animaux

Chez le bétail, les trypanosomes sont responsables de trois principales maladies : la *nagana*, le *surra* et la *dourine*. Les espèces impliquées dans ces maladies sont :

- *T. congolense* : découverte pour la première fois dans le sang de mouton et d'âne en 1904 en République Démocratique du Congo (RDC) par Broden, l'espèce *T. congolense* est endémique dans toutes les régions de l'Afrique subsaharienne où la mouche tsé-tsé (unique vecteur) est présente (Maudlin et al., 2004). Par sa fréquence, sa pathogénicité et ses conséquences sur la productivité, cette espèce constitue l'agent principal de la trypanosomose animale africaine ou *nagana* (Sidibe, 1996). C'est un parasite essentiellement intravasculaire mais qui peut également se retrouver au niveau extra-vasculaire (Silva Pereira et al., 2019).

D'un point de vue moléculaire (variation de répétition des principaux ADN satellites), plusieurs types de l'espèce *T. congolense* ont été caractérisés avec une répartition géographique et une pathogénicité différentes (Adams et al., 2010, Bengaly, 2003). On distingue le type « savane » qui se trouve dans les régions sèches l'Afrique de l'Ouest et de l'Est ; le type « forêt » rencontré dans les régions humides ou forestières, et les types « kilifi » et « tsavo » présents essentiellement en Afrique de l'Est (Majiwa et al., 1985).

- *T. vivax* : Il est le second trypanosome en termes d'importance vétérinaire en Afrique après *T. congolense*. Il a été décrit pour la première fois en Afrique en 1905 par Ziemann au Cameroun chez la chèvre (Stevens and Brisse, 2004). Comme pour *T. congolense*, il est répandu dans l'aire de répartition des mouches tsé-tsé qui le transmettent cycliquement et, potentiellement mécaniquement (Molloo et al., 2000). En outre, d'autres mouches piqueuses notamment les tabanidés et les stomoxes, le transmettent également de façon mécanique (Desquesnes et al., 2005, Solano et al., 1997). Du fait de la présence ubiquitaire de ces vecteurs mécaniques, *T. vivax* s'est répandu en Amérique du Sud. Appartenant au sous-genre *Duttonella*, *T. vivax* est l'espèce de trypanosomes pathogènes la plus virulente de trypanosomes pathogènes pour les bovins (Itard, 2000). Il est responsable d'une infection asymptomatique ou chronique, aiguë ou suraiguë, chez les bovins. Chez l'hôte mammifère, *T. vivax* est essentiellement intravasculaire mais peut également se retrouver au niveau du derme (Silva Pereira et al., 2019).
- Les espèces du sous-genre *Trypanozoon* : Le sous-genre *Trypanozoon* est le plus homogène de la section « *salivaria* » des trypanosomes. Il renferme trois espèces majeures qui sont identiques morphologiquement et très proches génétiquement mais qui présentent des caractéristiques épidémiologiques et pathologiques distinctes.
 - *T. brucei brucei* : Cette sous-espèce de *T. brucei* fait partir des principaux trypanosomes qui causent la trypanosomose animale africaine (TAA) ou *nagana*. Contrairement à *T. brucei gambiense* et *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei brucei* est non-pathogène pour l'homme. Elle a une importance moindre dans la *nagana* mais peut affecter une large gamme d'hôtes incluant les

équidés qui sont les plus sensibles (Giordani et al., 2016). *T. brucei brucei* est un excellent modèle biologique pour l'étude des trypanosomes. Certaines souches sont adaptées à la culture *in vitro* et ce parasite est facilement infectant pour les rongeurs de laboratoire. Il est essentiellement extravasculaire et peut envahir plusieurs tissus dont le derme (Capewell et al., 2016) et le tissu adipeux (revu dans Silva Pereira et al., 2019).

- *T. evansi* : agent d'une trypanosomose appelée « surra », l'espèce *T. evansi* est le trypanosome qui a la plus large répartition géographique. Le surra est présent, ou a été rapporté, dans le monde entier à l'exception de l'Amérique du Nord et de l'Australie (Desquesnes et al., 2008, Giordani et al., 2016, Stevens and Brisse, 2004). C'est une espèce monomorphique qui infecte préférentiellement les équidés et les camélidés. Elle est transmise uniquement par voie mécanique par les mouches piqueuses (tabanidés et stomoxes) à la différence de l'espèce *T. brucei* (Stevens and Brisse, 2004). Cette spécificité dans la transmission est caractéristique de ce trypanosome. La réduction (absence de maxicercles) ou l'absence d'ADN kinétoplastique chez *T. evansi* est responsable de l'absence de développement cyclique chez la glossine (Desquesnes et al., 2013, Stevens and Brisse, 2004).
- *T. equiperdum* : est un trypanosome pathogène des équidés et plus particulièrement des chevaux. Il est responsable de la *dourine*, une maladie vénérienne qui se transmet lors du coït des équidés. Il est monomorphique et identique à *T. evansi* d'un point de vue morphologique (Giordani et al., 2016, Stevens and Brisse, 2004).

— Les autres espèces de trypanosomes : *T. suis*, *T. godfreyi*, *T. simiae*, *Megatrypanum spp.*

Avec une transmission comparable à *T. brucei*, *T. suis* (formes métacycliques infectantes dans le proboscis) est le trypanosome typique des suidae (domestiques et sauvages) en Afrique tropicale de l'Est (Tanzanie et Burundi) (Itard, 2000). Il a été décrit pour la première fois en 1905 par Ochmann (revu dans Taylor and Authié, 2004) et constitue la seule espèce du sous-genre *Pycnomonas*. Il est monomorphique et infecte principalement les porcs, chez lesquels il provoque

une infection chronique et aiguë respectivement chez l'adulte et chez le jeune (Taylor and Authié, 2004). En sus de trypanosomes à haut pouvoir pathogène, il existe d'autres espèces de trypanosomes peu ou pas pathogènes mais ayant aussi un intérêt vétérinaire. C'est le cas de *T. simiae* (du même sous-genre que *T. congolense*) aussi pathogène des suidae. Les *Megatrypanum spp.* (section *Stercoraria*) peuvent interférer dans le diagnostic de trypanosomes. *T. godfreyei* est également cité dans la *nagana* (Giordani et al., 2016, Taylor and Authié, 2004).

1.3 Morphologie et structure

Les trypanosomes sont des parasites hématozoaires, fusiformes, aplatis et flagellés. Ils présentent une grande variété de taille selon les espèces et selon les phases de leur cycle cellulaire. Leur taille peut varier de 4 à 40 μm de long et de 2 à 5 μm de large (Giordani et al., 2016). Leur forme est définie par un cytosquelette hautement polarisé. Les organites uniques sont positionnés dans le cytosquelette qui conserve leur intégrité ainsi que celle de la cellule entière au cours du cycle cellulaire (Robinson et al., 1995). Les trypanosomes salivaires ont une surface entièrement recouverte d'un manteau de glycoprotéines, appelées VSG (Variant Surface Glycoprotein) ou glycoprotéines variantes de surface. Au cours du développement du parasite chez l'hôte mammifère, les VSG varient et lui permettent de s'y maintenir (revu dans Horn, 2014). Au microscope, le trypanosome apparaît après coloration May-Grunwald Giemsa (MGG) comme un élément allongé avec trois structures caractéristiques : un noyau central, un kinétoplaste dans la partie postérieure et un flagelle s'enroulant au tour du corps cellulaire (Kennedy, 2013). L'ultra-structure des trypanosomes (Vickerman et al., 1993) montre (Figure 1.2) :

- Une *paroi cellulaire ou périplasme* constituée de trois couches : une membrane plasmique, un réseau de microtubules servant de cytosquelette dans la face interne et au niveau externe (chez les formes sanguines), un manteau de glycoprotéines constitué presque exclusivement de VSG.
- Un unique *flagelle* qui assure la motilité du parasite chez l'hôte mammifère et son attachement dans le système digestif du vecteur. Ce flagelle est composé d'un

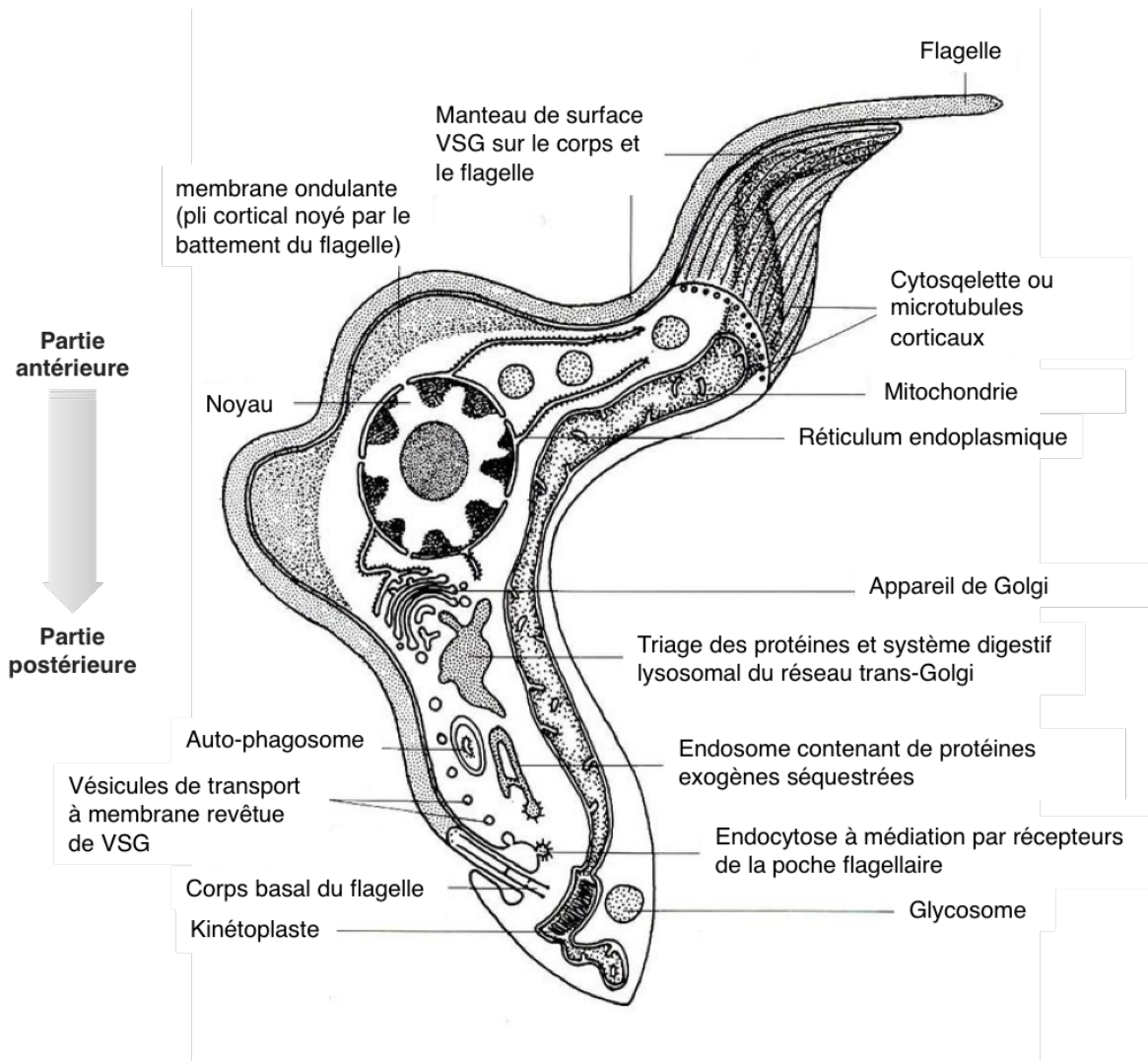


FIGURE 1.2 – Ultrastructure de la forme sanguine de *T. brucei*. Figure adaptée de Vickerman *et al.*, (1993) (Vickerman *et al.*, 1993).

axonème (formé par 9 doublets de microtubules périphériques et une paire centrale) et d'une tige paraflagellaire formée par un réseau des filaments (Vaughan and Gull, 2003), avec une membrane semblable à celle de la membrane plasmique qui en plus, permet au parasite d'adhérer aux épithéliums du vecteur par des hémidesmosomes (revu dans Ralston and Hill, 2008). Le flagelle s'enroule autour du corps cellulaire de la partie postérieure vers la partie antérieure avec une extrémité distale libre. Il forme un corps « en vrille » qui est à l'origine du nom « *Trypanosoma* ». *T. congolense* se distingue de *T. vivax* et de *T. brucei* par l'absence d'un flagelle libre (Giordani *et al.*, 2016, Osório *et al.*, 2008, Vickerman, 1969).

— Un *corps basal* : le flagelle émerge du corps basal auquel il est lié par un filament

de microtubules. Le corps basal ressemble à des centrioles des cellules animales et est lié par une série des filaments au génome mitochondrial du kinétoplaste. Ces filaments servent de guide à la fois pour la réplication de ce génome mais aussi de sa ségrégation, de celle du corps basal et du flagelle lors de la division cellulaire (Gull, 2003, Ogbadoyi et al., 2003, Robinson and Beverley, 2003)

- Une *poche flagellaire*, invagination en forme d'outre au niveau de laquelle sort le flagelle. La poche flagellaire constitue le seul point d'échange entre le parasite et son hôte par endo- et exo-cytose (Overath and Engstler, 2004). Grâce à ces phénomènes d'endo- et d'exo-cytose, le parasite recycle son manteau glycoprotéique pour persister en échappant au système de défense de son hôte.

- Le *noyau*, le *reticulum endoplasmique (RE)* et l'*appareil de Golgi*. Ces organites se présentent comme ceux habituellement retrouvés chez les eucaryotes. Le noyau renferme l'information génétique dans une enveloppe formée de deux feuillettes accolés et percés des pores. Il est central chez *T. congolense* et légèrement situé en arrière chez *T. brucei*. Le RE lié à l'enveloppe nucléaire, à l'appareil de Golgi et à la mitochondrie, se concentre essentiellement entre le noyau et la poche flagellaire. Comme chez les autres eucaryotes, la synthèse protéique se fait au niveau du RER (RE rugueux) et le repliement de peptides au niveau du REL (RE lisse) avant leur acheminement vers l'appareil de Golgi. Ce dernier constitue le lieu de maturation et d'adressage des protéines. En sus des *lysosomes*, des *endosomes* et plusieurs vésicules de fonction indéterminée, l'appareil de Golgi se situe également entre le noyau et la poche flagellaire, à laquelle, il est étroitement lié pour les échanges avec l'extérieur (endo- et exo-cytose) (Vickerman et al., 1993).

- Le *kinétoplaste et la mitochondrie* : Le kinétoplaste est situé à proximité du corps basal. Il forme un ensemble continu avec la mitochondrie, qui s'étend sur toute la longueur du corps cellulaire en allant de la partie postérieure vers la partie antérieure (Vickerman, 1969, Vickerman et al., 1993). Caractérisant les *Kinetoplastidae*, le kinétoplaste contient 10 à 20% de l'ADN du parasite appelé ADN kinétoplastique. Ce dernier est constitué d'un réseau complexe de cercles d'ADN

double brin de taille différente, maxi- et mini-cercles. Les premiers codent pour les gènes mitochondriaux et les seconds codent les ARN guides essentiels à l'édition des ARN messagers (ARNm) (El-Sayed et al., 2000). La mitochondrie est très développée et ramifiée chez les formes procycliques (Procyclic Form, PCF), chez l'insecte vecteur. En effet ces formes sont capables de métaboliser dans la mitochondrie différentes sources de carbone dont la proline qui est abondamment présent chez le vecteur. Le catabolisme de cet acide aminé dans la mitochondrie conduit à une sécrétion importante d'alanine (revu dans Michels et al., 2021). Chez les formes sanguines (Bloodstream Form, BSF, chez l'hôte mammifère), la mitochondrie ne joue pas un rôle aussi important dans le métabolisme énergétique. La production d'énergie dépend du catabolisme du glucose par la glycolyse (revu dans Michels et al., 2021, Smith et al., 2017).

- Les *glycosomes* : ce sont des compartiments apparentés aux peroxysomes spécifiques des *Kinetoplastidae*. On y trouve les sept premières étapes de la glycolyse, mais aussi d'autres voies métaboliques telles que la voie de pentoses phosphates, la néoglucogénèse et le métabolisme des purines. Leur composition et l'activité des enzymes qu'il contiennent changent profondément au cours du cycle évolutif des trypanosomes (Gualdrón-López et al., 2012, Opperdoes and Borst, 1977).

1.4 Biologie des trypanosomes

1.4.1 Mode de multiplication

Les trypanosomes se reproduisent presque exclusivement par division binaire asexuée ou scissiparité, une cellule mère donnant deux cellules filles. Le cycle de division a été le plus étudié chez la forme procyclique de *T. brucei*. Il comporte 4 phases (G0/G1 ; S, G2 et M). Au stade G0/G1, tous les organites sont en unique copie. Le dédoublement des organites se fait progressivement en commençant par le flagelle. Le kinétoplaste qui est le second organite à se dédoubler à la phase S et G2, suit un cycle de division légèrement décalé par rapport à celui du noyau (Figure 1.3). À la fin de leur duplication, les organites se séparent à la phase M et s'en suit une division longitudinale de

la cellule en deux cellules trypomastigotes (McKean, 2003).

Bien qu'il n'y ait aucune évidence concrète, il existe une hypothèse sur une possible reproduction sexuée chez *T. brucei*. En effet, dans les années quatre vingt dix, Kooy a identifié en culture des formes haploïdes chez cette espèce, qui seraient des « gamètes ». Les études de Gibson *et al.* (1994) sont également en faveur d'une méiose chez *T. brucei*. Ces auteurs ont montré que, chez la glossine il y aurait une recombinaison génétique des hybrides de deux souches de trypanosomes résistantes à deux antibiotiques différents. Récemment, Gibson et Paacock (2019) ont identifié chez *T. brucei* le stade de division méiotique et les gamètes à l'intérieur des glandes salivaires de la mouche, en utilisant des protéines fluorescentes (Gibson and Paacock, 2019). Trois années plutôt, Gibson (2015) était arrivé à la conclusion que l'échange génétique qui a lieu chez l'insecte n'est pas obligatoire pour le cycle évolutif de *T. brucei* (Gibson, 2015). Ces évènements génétiques sont rares voire inexistantes chez les trypanosomes d'après certains généticiens qui seraient plutôt en faveur d'une reproduction essentiellement clonale (Cuisance, 1995, Rotureau and Van Den Abbeele, 2013, Simo *et al.*, 2010). Certains auteurs imputent également la diversité génétique de *T. congolense* à la fréquence des hybridations (Tihon *et al.*, 2017). Ces échanges de matériels génétiques n'interviendraient que dans certaines conditions particulières, par exemple lors d'un stress nutritionnel ou sous une pression de sélection comme le souligne Hope *et al.*, (1999) (Hope *et al.*, 1999).

1.4.2 Le cycle parasitaire

Les trypanosomes africains, à l'exception de *T. equiperdum* qui est adapté à la transmission vénérienne, et de *T. evansi*, transmis mécaniquement, possèdent un cycle de développement biologique très complexe. Il se caractérise par une série de transformations morphologiques et physiologiques engendrant différentes formes parasites en fonction de l'hôte. Ce cycle concerne essentiellement la reproduction clonale ou asexuée et se réalise souvent chez deux hôtes, un hôte vertébré, le plus souvent un mammifère (homme, faune sauvage généralement réservoirs de parasites ou faune domestique), mais aussi reptiles et un hôte invertébré, un insecte hématophage (Figure 1.4).

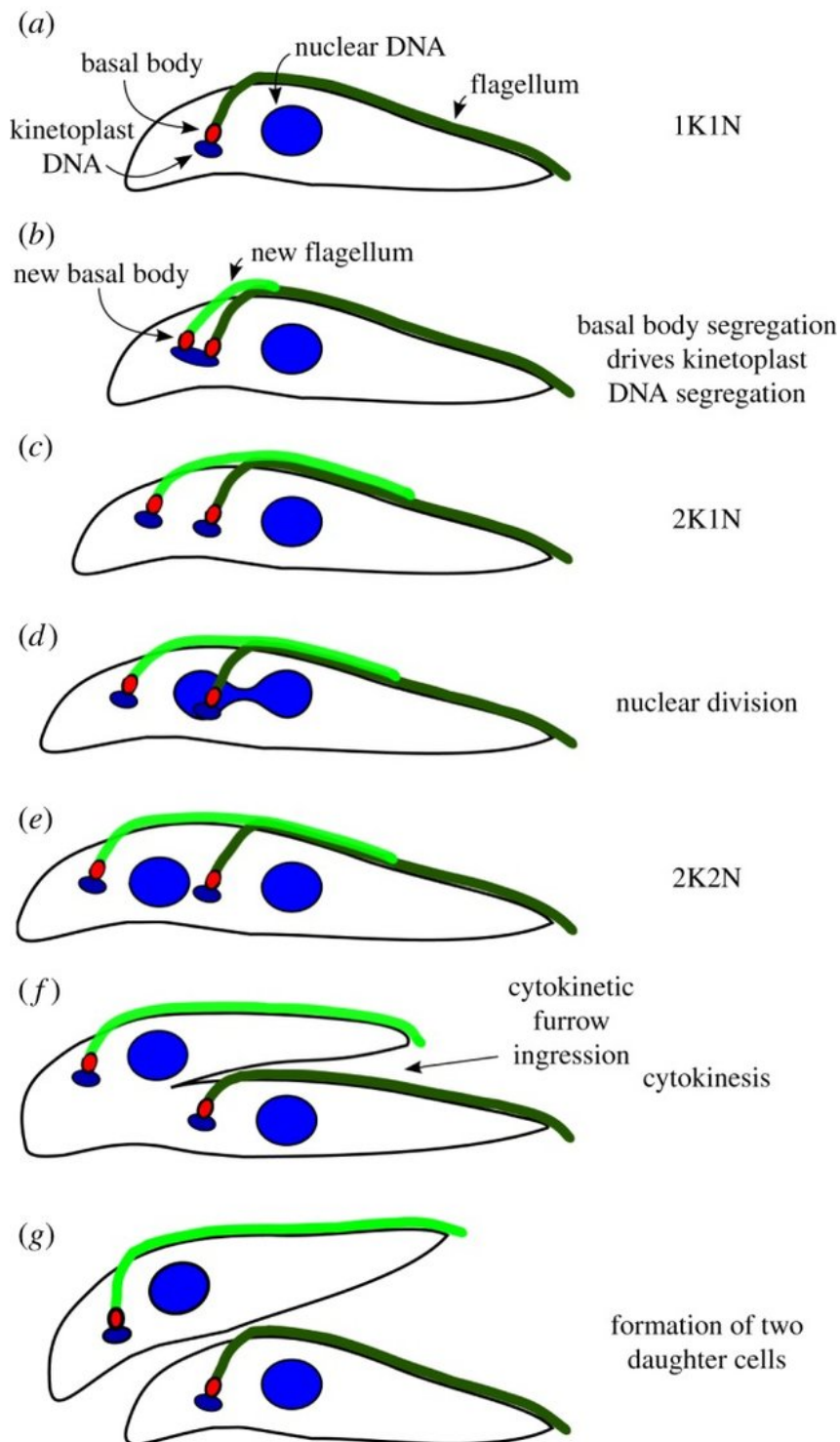


FIGURE 1.3 – Diagramme du cycle de division cellulaire de cellules procycliques de *T. brucei*. (a) Les cellules G1 possèdent un seul Kinétoplaste et noyau (appelé 1K1N) ainsi qu'un flagelle attaché. (b) Au cours du cycle cellulaire, un nouveau corps basal se forme et un nouveau flagelle est nucléé. Le noyau est toujours en phase S lorsque l'ADN du kinétoplaste présente une morphologie allongée. (c) La séparation des corps basaux conduit à la séparation du kinétoplaste attaché. Ces cellules sont appelées 2K1N. (d) Les cellules entrent en phase nucléaire M, et la séparation des chromosomes se produit. (e) La division nucléaire est terminée. Ces cellules sont appelées 2K2N. (f) Un sillon de clivage se forme entre les deux flagelles. (g) À la fin du cycle cellulaire, deux cellules filles sont formées, et chaque cellule hérite d'un seul kinétoplaste, noyau et flagelle. Figure tirée de Akiyoshi and Gull (2013) (Akiyoshi and Gull, 2013).

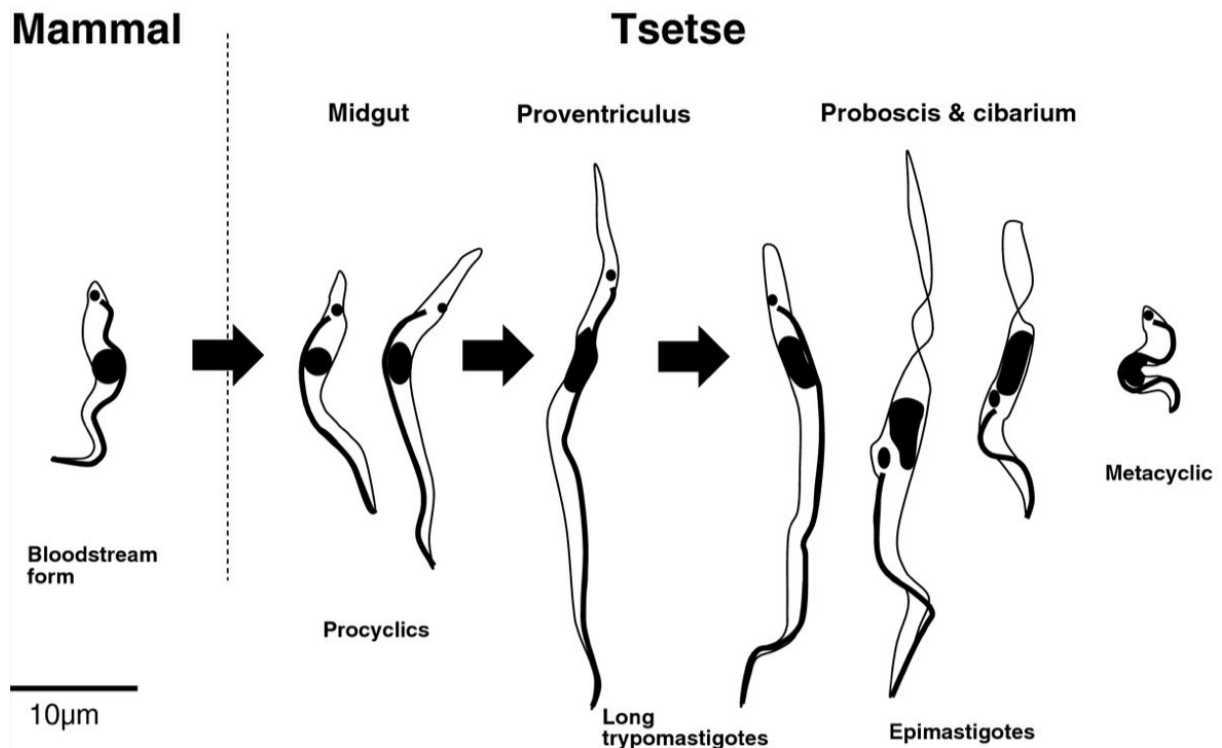


FIGURE 1.4 – Les étapes du cycle évolutif de *T. congolense*. Figure tirée de Peacock *et al.*, (2012) (Peacock *et al.*, 2012).

Dans la suite de ce manuscrit, nos travaux portant sur la trypanosomose animale africaine, nous allons nous focaliser essentiellement sur les trois espèces majoritairement impliquées *T. congolense*, *T. vivax*, et *T. brucei brucei*.

1.4.2.1 Chez la mouche tsé-tsé

Les glossines se contaminent à vie en absorbant des formes trypomastigotes courtes à la suite d'un repas sanguin sur un hôte infecté par les trypanosomes. Les trypanosomes ingérés subissent des transformations et des réplifications selon un cycle complexe dans le tractus digestif aboutissant à des formes métacycliques infectantes pour l'hôte mammifère.

Si l'on prend l'exemple de *T. congolense*, le développement se fait successivement dans l'intestin moyen, l'intestin antérieur et le proboscis de la glossine (Jackson *et al.*, 2015). Les formes trypomastigotes ingérées, après avoir perdu leur manteau glycoprotéique et activé la respiration cellulaire par le développement de la mitochondrie, se transforment en formes promastigotes ou procycliques. Ces dernières se multiplient activement dans l'intestin moyen dans lequel ils migrent de l'espace endopé-

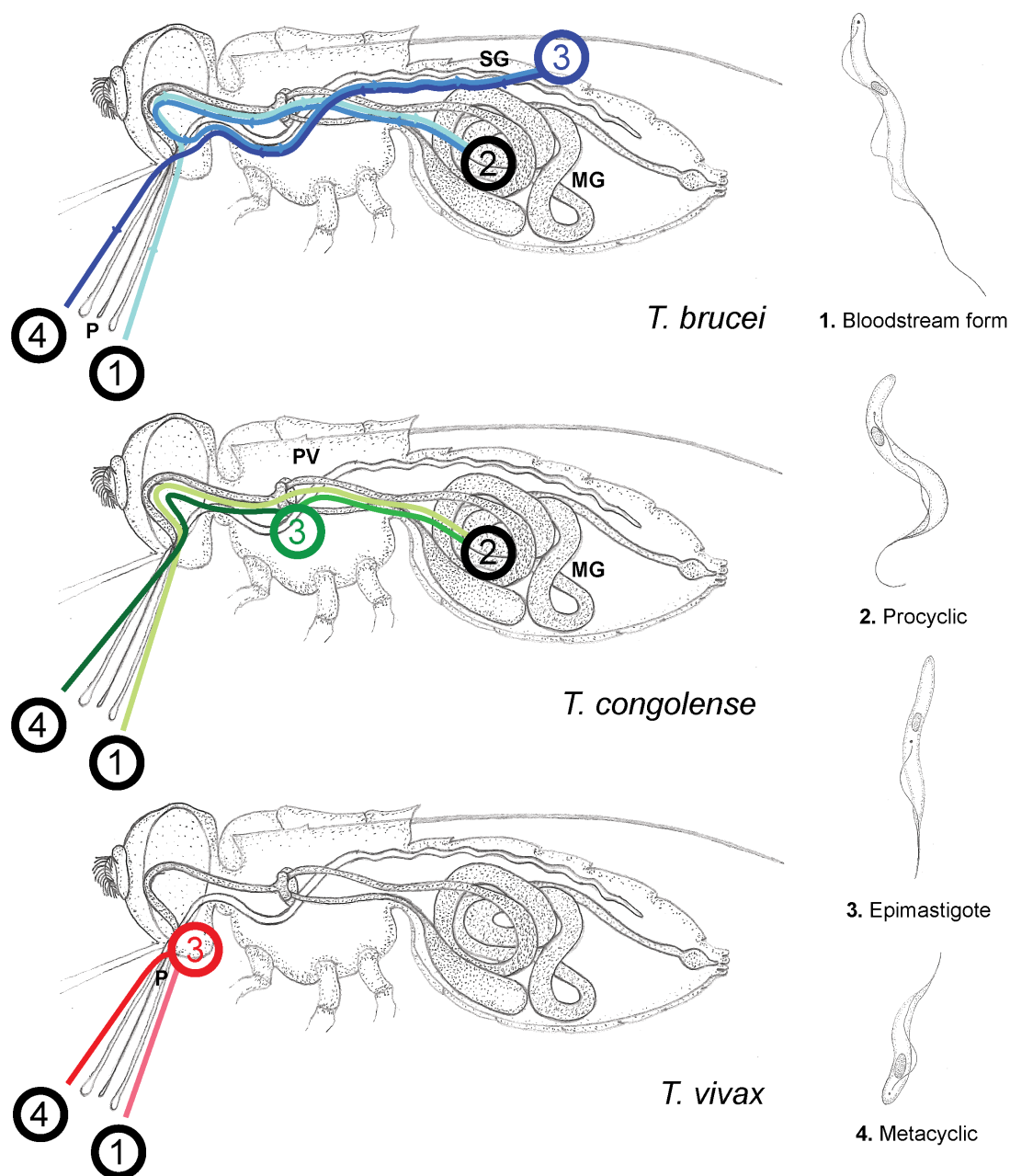


FIGURE 1.5 – Variation du cycle évolutif de trypanosomes africains. Proboscis (P), intestin moyen (MG), glande salivaire (SG), proventricule (PV). Stades du cycle de vie chez la mouche : (1) Ingestion des formes sanguines de parasites ; (2) migration des parasites vers l'intestin moyen de l'insecte avec différenciation en formes procycliques (*T. vivax* n'a pas ce stade) ; (3) migration vers l'avant du proboscis (*T. vivax*), le proventricule (*T. congolense*) ou la glande salivaire (*T. brucei*) et différenciation en formes épimastigote ; (4) différenciation en formes métacycliques et inoculation à l'hôte vertébré lors de l'alimentation de l'insecte (Jackson et al., 2015).

ritrophique vers l'espace ectopéritrophique. De cette localisation, les trypanosomes remontent par le proventricule vers l'œsophage et le proboscis. À ce niveau, les procycliques se transforment en épimastigotes et pénètrent dans l'hypopharynx pour devenir des métatrypanosomes infectants, ou formes métacycliques avec l'apparition du manteau antigénique formé de glycoprotéines (Figure 1.4) (Peacock et al., 2012). À la différence de *T. congolense*, *T. vivax* n'a pas de formes procycliques dans l'intestin moyen de la glossine et n'a pas de migration complexe dans l'insecte ; *T. vivax* se développe plutôt directement en formes épimastigotes dans le proboscis. Cette différence pourrait expliquer pourquoi *T. vivax* peut être transmis par d'autres types d'insectes piqueurs. Contrairement à ces deux dernières espèces, les formes métacycliques de *T. brucei* se retrouvent (en attente) dans les glandes salivaires. Morphologiquement très comparables aux formes sanguines, les métatrypanosomes sont des formes pré-adaptées à l'hôte mammifère (Figure 1.5). En plus de la différence sur la localisation du déroulement, la durée du cycle chez la glossine varie également selon l'espèce de trypanosomes. Elle est en moyenne de 20 à 30 jours chez *T. brucei*, 12 à 18 jours chez *T. congolense* et 5 à 14 jours chez *T. vivax* (Jackson et al., 2015, Rotureau and Van Den Abbeele, 2013).

1.4.2.2 Chez l'hôte mammifère

Les trypanosomes pathogènes africains sont transmis par la salive de leurs vecteurs, d'où leur appartenance au groupe des *Salivaria*. Lors d'un repas de sang, la glossine injecte les formes métacycliques présentes dans ses pièces buccales dans le derme de l'hôte mammifère. La réaction inflammatoire locale et la lésion cutanée occasionnées par la piqûre forment parfois un chancre d'inoculation ou trypanome. Au niveau de ce point, les trypanosomes se multiplient se différencient en formes sanguicoles, migrent ensuite jusqu'à la circulation sanguine par la voie lymphatique (Akol and Murray, 1986). Dans le sang, la durée de la période pré-patente, la durée de l'inoculation à la détection du parasite, est de 1 à 3 semaines en fonction de l'espèce et de la souche de trypanosome en cause, du nombre de parasites injectés par la glossine et de l'état immunitaire de l'hôte mammifère (Clausen et al., 1993).

Chez l'hôte mammifère, la plupart de trypanosomes et plus particulièrement l'espèce *T. brucei*, est pléomorphe. Différentes formes apparaissent successivement :

des formes trypomastigotes longues et minces se divisant activement, des formes trypomastigotes intermédiaires puis des formes trypomastigotes courtes et traques ne se divisant plus et préadaptées à l'infestation de la glossine (Matthews and Gull, 1994).

Dans le système sanguin de l'hôte mammifère, les trypanosomes, qui ont revêtu leur manteau glycoprotéique, changent régulièrement de spécificité antigénique (Horn, 2014). Grâce à ce phénomène, les trypanosomes évoluent par « vagues parasitémiques » et parviennent ainsi à persister en échappant au système immunitaire de l'hôte.

1.4.3 La variation antigénique

Les trypanosomes de la section *Salivaria*, ont développé au cours de leur évolution, le processus de variation antigénique leur permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte mammifère. Les trypanosomes de formes sanguines et métacycliques infectieuses pour l'hôte mammifère sont recouverts entièrement, à l'exception de leur poche flagellaire, par des glycoprotéines appelées VSG (Variable Surface Glycoprotein) (Vickerman, 1969). La VSG est une protéine homodimère ancrée dans la membrane plasmique du trypanosome par un radical glycosyl-phosphatidylinositol (GPI). Elle présente des régions au niveau N-terminale dites hypervariables et une partie C-terminale conservée avec un domaine dit CRD (Cross reacting determinant), responsable de la réactivité croisée entre différentes VSG. La glycoprotéine VSG représente 10% de protéines totales du parasite et est constituée de 10^7 molécules identiques (Bangs, 2018). Sa répartition est dense et compacte pour *T. brucei* et *T. congolense* et apparaît plus diffuse pour *T. vivax*. Elle a une masse moléculaire en moyenne de 65 kDa chez *T. brucei* et de 50 kDa chez *T. congolense* (Authiée et al., 1993) et *T. vivax*.

La variation antigénique liée aux molécules de VSG, se traduit par l'apparition successive, au cours de l'infection, de parasites portant des types antigéniques variables (VAT, Variable Antigenic Type) immunodominants de VSG masquant les antigènes invariants. À chaque moment de l'infection, les trypanosomes synthétisent et présentent majoritairement au système immunitaire de l'hôte mammifère un seul type de variant VSG (homotype) ce qui leur permet d'évoluer en « vague parasitémique ». À mesure qu'une réponse immunitaire spécifique se développe contre le VAT exprimé, le nombre

de trypanosomes ayant un VAT homologue diminue suite à la réponse humorale du système immunitaire de l'hôte. Les trypanosomes ayant un VAT hétérologue survivent, se divisent et déclenchent une seconde vague de parasitémie et leur VAT devient le nouveau homotype dominant dans une population mixte de parasites exprimant jusqu'à 100 VSG distinctes, et ainsi de suite (Barry et al., 2004) (Figure 1.6).

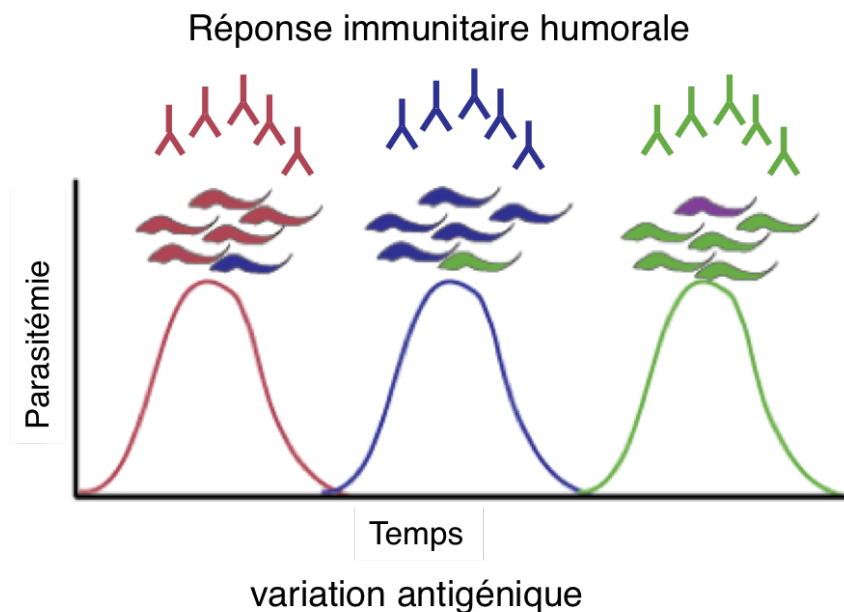


FIGURE 1.6 – Phénomène de variation antigénique chez les trypanosomes. Figure adaptée de l'image originale consultée le 26/02/2021 sur : <https://www.mugnierlab.org/research>.

D'un point de vue génomique et si l'on prend l'exemple de *T. brucei*, il existe plus de 2500 gènes codant pour des VSGs (le « VSGnome ») dont 80% sont des pseudo-gènes (Black and Mansfield, 2016, Cross et al., 2014). Les gènes actifs de VSG sont situés à proximité des régions télomériques de trois types de chromosomes et en particulier dans les régions sub-télomériques des mégachromosomes. Leur expression prend place au niveau des sites dits télomériques. Il existe 15 à 20 de ces sites d'expression de VSG, constituant l'unique point de contrôle du processus de variation antigénique (Bangs, 2018). Deux mécanismes moléculaires permettent ce processus : l'activation télomérique consistant à la commutation de la transcription d'un site à un autre et la recombinaison génétique dans laquelle un gène codant situé dans le site actif d'expression est remplacé par un gène non-exprimé par conversion génique (Cross et al., 2014). Plus rarement, la recombinaison peut également faire intervenir la permutation de télomères (Bangs, 2018, Cross et al., 2014).

Les VSG, de par leur abondance et leur antigénicité, représentent la principale cible de la réponse immunitaire de l'hôte. L'hétérogénéité de VATs rend difficile l'acquisition d'une immunité durable même s'il a été démontré que l'immunisation des bovins par des VSGs purifiées les protégerait des infections homologues (Taylor, 1998). Cette variation antigénique due aux VSG est la principale contrainte au développement d'un vaccin classique contre les infections aux trypanosomes. Par ailleurs, des études immunologiques ont montré que l'immunosuppression induite par les trypanosomes au cours de l'infection empêchait la permanence de cellules mémoires (Radwanska et al., 2008), ce qui offrait peu d'espoir de développer un vaccin efficace jusqu'à récemment. En effet Autheman *et al.* (2021) ont montré l'efficacité d'un vaccin anti-*T. vivax*, basé sur un antigène invariant du flagelle, qui conférait une excellente protection contre l'infection à *T. vivax* chez la souris (Autheman et al., 2021).

1.4.4 Organisation du génome des trypanosomes

Les trypanosomes africains disposent de deux génomes : un dans le noyau appelé génome nucléaire et l'autre mitochondrial localisé dans le kinétoplaste. Le génome nucléaire présente une plasticité inter- et intra-espèces en termes de nombre et de taille des chromosomes, tandis que le génome mitochondrial varie en nombre de minicercles et au niveau de la région variable, de maxicercles (El-Sayed et al., 2000).

1.4.4.1 Le Génome nucléaire

Le génome nucléaire des trypanosomes est d'environ $3,5 \times 10^7$ pb, ce qui est du même ordre de grandeur que les génomes de parasites tels que *Plasmodium falciparum*, *Leishmania major* et *T. cruzi*. Il est de faible complexité avec environ 68% de séquences en simple copie et contient plus d'une centaine de chromosomes classés en trois groupes en fonction de leur taille de migration en électrophorèse en champ pulsé (PFGE, Pulsed-Field Gel Electrophoresis). On distingue des grands chromosomes dont il existe au moins 11 paires (I-XI) allant de 1 Mb à plus de 6 Mb (Melville et al., 1998, 2000). Ces mégachromosomes représentent environ 80% du génome nucléaire et portent la plupart des gènes impliqués dans les fonctions de base du trypanosome d'où leur appellation de chromosomes « housekeeping », chromosomes de ménage. En plus de leur domaine central contenant les gènes constitutifs, les mé-

gachromosomes contiennent également des régions sub-téломériques refermant des gènes VSG et leurs sites d'expression (ES, Expression Site). Les réarrangements et les répétitions de ces gènes et les sites d'expression sont responsables de la variété de taille entre les paires chromosomiques et les chromosomes homologues au sein d'une même paire, d'une souche de trypanosome à une autre (El-Sayed et al., 2000).

Les deux autres types de chromosomes sont de ploïdie incertaine. Ces sont : les chromosomes de taille intermédiaire de 200 à 900 kb et les minichromosomes de tailles variant entre de 50 à 150 kb. Les chromosomes intermédiaires représentent entre 0,2 et 1% du génome nucléaire. Comme pour les mégachromosomes, ils sont constitués d'un domaine central flanqué des séquences sub-téломériques répétées de 177 pb (Wickstead et al., 2004). Ils contiennent également des sites d'expression des VSG. Les minichromosomes possèdent les mêmes (5'-TTAGGG-3')ⁿ répétitions que les autres chromosomes. Il y a environ une centaine de minichromosomes représentant près de 20% du contenu de l'ADN nucléaire. Ils sont principalement constitués de réseaux internes en tandem d'une répétition de 177 pb, pouvant représentés plus de 90 % de la séquence de certains minichromosomes. À la différence des grands chromosomes et des chromosomes intermédiaires, les minichromosomes peuvent contenir des séquences répétées spécifiques qui sont soit riches en GC (Guanine, Cytosine) soit riches en AT (Adénine, Thymidine) et se trouvant entre les télomères et la répétition interne de 177 pb. Dernière caractéristique, les minichromosomes peuvent également servir de dépôts pour les gènes VSG (El-Sayed et al., 2000).

1.4.4.2 Le Génome mitochondrial ou kinétoplastique

L'ADN mitochondrial contenu dans le kinétoplaste (ADNk) représente 10 à 20% de l'ADN cellulaire total des trypanosomes. Il est constitué de deux types de molécule d'ADN circulaire dites minicercles ou maxicercles en fonction de leur taille. Ces molécules s'imbriquent les unes dans les autres comme un disque aplati de cercles d'ADN pour former le réseau d'ADNk. Elles contiennent des séquences nucléotidiques répétées et spécifiques à chaque espèce de trypanosomes.

1.4.4.2.1 Les minicercles

Les minicercles ont une taille d'environ 1 Kb et un nombre variant entre 5000 et 20 000.

Ils sont formés d'une région conservée de 100 à 150 pb et d'une région variable de 850 à 900 pb (Chen and Donelson, 1980). Très hétérogènes, les minicercles peuvent varier énormément au sein d'une même espèce ou d'une même souche avec un nombre de classes estimé à plus de 200 (caractéristique souvent exploitée pour l'identification d'espèce au sein du groupe trypanozoon). Les minicercles codent uniquement pour des ARN guides (ARNg) impliqués dans le processus de l'édition des transcrits mitochondriaux codés par les maxicercles (Cooper et al., 2019).

1.4.4.2.2 Les maxicercles

À la différence des minicercles, les ADN maxicercles kinétoplastiques comptent 30 à 50 molécules de maxicercles par cellule, d'environ 20 kb chacune, codant deux ARNr mitochondriaux (Sous-unités ribosomiques 9S et 12S) et 17 protéines impliquées dans la respiration cellulaire au niveau de la mitochondrie. Une molécule d'ADN maxicercle est constituée d'une région conservée de 17 Kb portant l'ensemble des gènes codés et d'une région variable de 3 à 6 Kb. Leur taille varie selon les espèces de trypanosomes et le fait qu'elles soient absentes chez *T. evansi* ou partiellement absentes chez *T. equiperdum* (Lai et al., 2008, Sánchez et al., 2015), fait d'elles des cibles privilégiées du diagnostic d'espèce par les techniques moléculaires (Stuart et al., 2005).

1.5 Les vecteurs de trypanosomes

Les trypanosomoses sont toutes des maladies à transmission vectorielle à l'exception de la trypanosomose animale de type *dourine*. Les trypanosomes peuvent être transmis par des vecteurs cycliques (les glossines) ou de façon mécanique par d'autres insectes hématophages y compris les glossines.

1.5.1 Les vecteurs cycliques : glossines

Du terme grec « *Glossina* » qui signifie « langue », en référence à ses pièces buccales de forme allongée, la glossine ou mouche tsé-tsé est le seul vecteur cyclique des trypanosomes africains, pathogènes des humains et des animaux. Les glossines sont des insectes hématophages de l'ordre de diptères, appartenant à la famille des *Glossinidae* et au genre *Glossina* (Buxton et al., 1955). Elles sont caractérisées par l'adaptation de leurs pièces buccales à la piqûre, les distinguant des autres Muscoidea.

D'un point de vue morphologique, ce sont des mouches avec une silhouette allongée et mesurant entre 6 à 16 mm de longueur sans leur trompe (proboscis). Les mâles sont plus petits que les femelles mais ils sont tous d'aspect robuste. Leur coloration peut varier de brune noirâtre à brun testacé mais jamais métallique (Figure 1.7) (Itard, 1986, Krinsky, 2019).

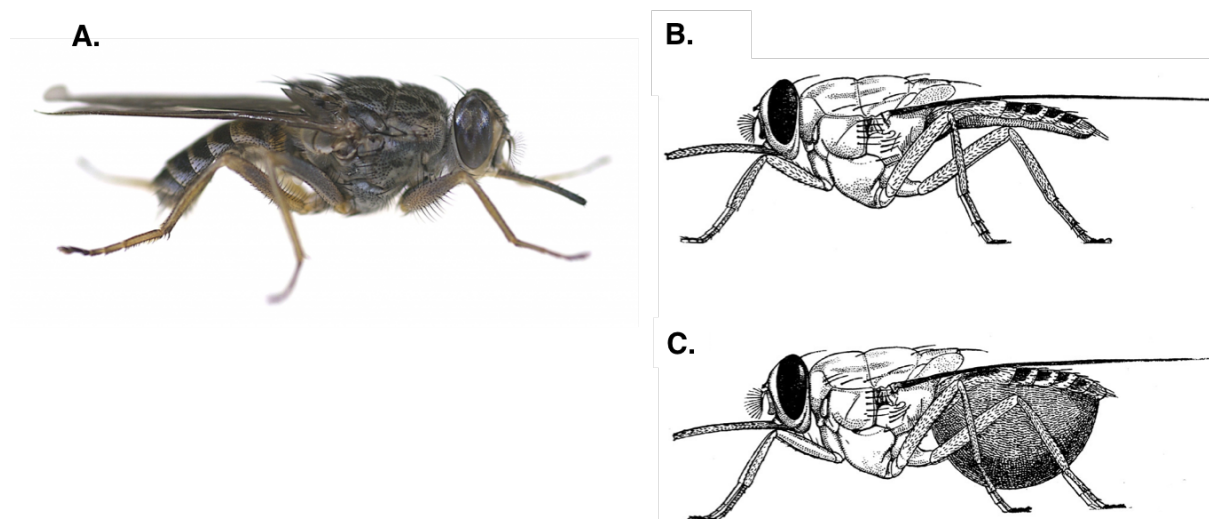


FIGURE 1.7 – Morphologie d'une glossine. **A.** La mouche tsé-tsé de la savane, *Glossina morsitans* (image obtenue de Brice Rotureau sur : <https://research.pasteur.fr/en/team/group-brice-rotureau/>), **B-C.** Une femelle de *Glossina morsitans*. B. avant de se nourrir; C. après s'être nourrie. Les dessins B et C sont tirés de Krinsky (2019) (Krinsky, 2019) et initialement de Austen (1903).

Les mouches tsé-tsé ont besoin pour survivre d'une température et d'une humidité exclusivement rencontrées dans les zones tropicales avec un éco-climat particulier (hygrométrie optimale de 65 à 85% d'humidité et un optimum thermique autour de 25°C). Elles vivent quasi-exclusivement en Afrique où elles infestent un tiers des superficies terrestres soit environ 10 millions de kilomètres carrés (Km²) et affectent plus de 38 pays d'Afrique subsaharienne (Figure 1.8) (Krinsky, 2019). Toutefois, avant les années 2000, l'île de Zanzibar était également infestée. De plus, une vingtaine de spécimens de *G. morsitans* et *G. fuscipes* ont été observés au sud-ouest de l'Arabie saoudite (Elsen et al., 1990). Cependant, ne supportant pas une température dépassant 36°C ou inférieure à 16°C (Are and Hargrove, 2020), elles sont absentes dans les zones sahéliennes et désertiques et dans les régions montagneuses du sud de l'Afrique. En sus de ce facteur lié aux conditions de température et d'humidité, la croissance démographique humaine qui entraîne une modification des habitats, et les sécheresses

épisodiques observées dans les régions de leur répartition, ont fortement diminué l'aire occupée par les glossines, qui ne vaut plus les 10 millions de Km² (Solano et al., 2018).

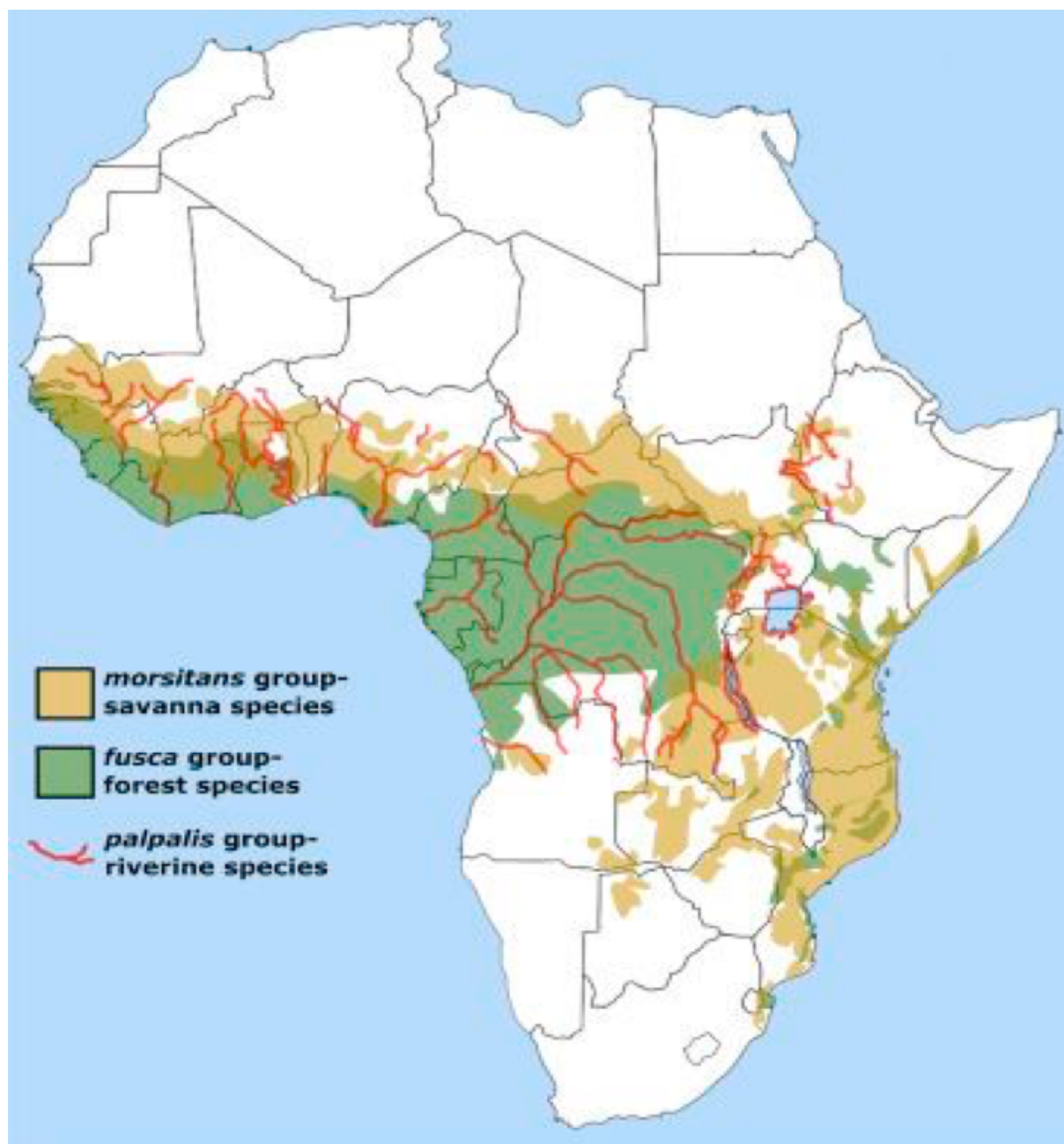


FIGURE 1.8 – Distribution des groupes de mouches tsé-tsé *Morsitans*, *Fusca* et *Palpalis* à travers l’Afrique. Figure tirée de "Tsetse flies (Glossinidae)"(Krinsky, 2019).

Il existe 31 espèces et sous-espèces de glossines réparties en 3 sous-genres ou « groupes » et classées en fonction de la forme des genitalia mâles et femelles, de la répartition géographique, et de certains caractères bioécologiques et morphologiques (couleur, présence de soies, etc). Parmi elles, seules 8-15 espèces et sous-espèces

sont d'une importance médicale/vétérinaire et, par voie de conséquence, économique. Les trois grands groupes décrits sont (Solano et al., 2018) :

- le sous genre *Austenina* (groupe *Fusca*) compte 15 espèces de glossines de grande taille (11-16 mm). Elles se nourrissent rarement sur l'homme et ont une répartition généralement en dehors des zones à vocation pastorale. De ces faits, elles ont une importance économique mineure (Jordan et al., 1986).
- le sous genre *Nemorhina* (groupe *Palpalis*) de taille moyenne (8-11 mm) ou petite (6-8 mm). Il y a 9 espèces de *Palpalis*, toutes vivant dans la forêt tropicale de plaine, le long des réseaux hydrographiques des savanes humides et dans les galeries forestières (Solano et al., 2018). Elles sont appelées « glossines riveraines » et comptent les principaux vecteurs de la trypanosomose humaine africaine. Elles sont dotées d'une grande capacité d'adaptation à leur environnement et à leur hôte. Certains auteurs ont rapporté leur présence dans des zoos ou des forêts conservées des grandes villes d'Afrique Francophone (Dakar, Abidjan, Conakry, Kinshasa, etc) (Bouyer et al., 2010, Solano et al., 2018). Les espèces (vecteurs) les plus importantes sont *G. tachinoides*, *G. p. palpalis* et *G. p. gambiensis* (pour les TAA en Afrique de l'Ouest, et aussi pour la THA concernant cette dernière) ; *G. f. fuscipes* et *G. f. quanzensis* (pour la THA en Afrique centrale) et enfin *G. p. gambiensis* (pour la THA en Afrique occidentale) (Jordan et al., 1986, Solano et al., 2018, Vreysen et al., 2013).
- le sous genre *Glossina stricto sensu* (groupe *Morsitans*) rassemble sept espèces de taille moyenne comprise entre 8 et 11 mm. Elles colonisent très préférentiellement les savanes d'où leur appellation de mouches tsé-tsé des savanes (Jordan et al., 1986). Vecteurs majeurs de trypanosomoses (humaine et animale) en Afrique australe et orientale, les espèces les plus importantes de ce groupe sont : *G. morsitans spp.* et *G. pallidipes*. Elles sont plus sensibles à l'anthropisation par rapport au groupe de *Palpalis* (Van den Bossche et al., 2010).

La prise de repas sanguin par la glossine chez son hôte est un processus hautement élaboré. Les deux sexes de l'insecte sont hématophages plus précisément

solénophages. Grâce à leur proboscis, les glossines incisent la peau de leur hôte et coupent les capillaires sanguins créant une micro-hémorragie sous-cutanée. Elles pompent par la suite le sang directement dans les capillaires (Leak, 2009, 1999). Le sang passe par l'œsophage et rejoint le jabot pour y être stocké, puis l'intestin pour la digestion après un passage dans le proventricule où il sera enveloppé par une membrane péritrophique. Pendant la prise du repas sanguin, la salive de la glossine contenant des protéines et des peptides (sialome avec des propriétés anticoagulantes et vasodilatatrices) s'écoule par l'hypopharynx et injectée au niveau du point de piqûre (Champagne, 2004). Ce sialome constitue actuellement un outil précieux à la base de la découverte de marqueurs moléculaires utilisés pour mesurer l'exposition des hôtes, notamment bovins, aux piqûres de glossines (Somda et al., 2013). Par ailleurs, le repas sanguin que prend la mouche tsé-tsé est indispensable à son cycle biologique (fécondité des adultes, activité ovarienne, stockage de graisse, développement larvaire etc.). Le volume et la fréquence des repas sanguins sont fonction de l'espèce de glossine et des conditions environnementales, notamment d'humidité (Leak, 1999, Randolph et al., 1992). Plusieurs facteurs déterminent le degré d'infection d'une population de glossines par les trypanosomes : les espèces de trypanosomes et de mouches en présence, le nombre de repas, l'âge et le sexe des glossines et la saison (Itard et al., 1981) et d'autres facteurs actuellement étudiés comme le microbiote (Farikou et al., 2010, Geiger et al., 2007). La capacité vectorielle des glossines est souvent associée à la transmission préférentielle des espèces de trypanosomes. Autrement dit chaque groupe de mouches transmet préférentiellement une espèce de trypanosome donnée (Cuisance, 1995).

À côté de cette transmission cyclique ou oro-digestive, les glossines sont également capables de transmettre les trypanosomes de façon mécanique entre deux repas sanguins d'un intervalle très court (Moloo et al., 2000). Toutefois, elles occupent moins d'importance dans ce processus qui est plutôt le fait d'autres mouches hématophages.

1.5.2 Les vecteurs mécaniques : Tabanidés et Stomoxyinés

La transmission mécanique est un phénomène qui a lieu à la suite d'un repas sanguin interrompu sur un hôte infecté et achevé sur un autre hôte dans les quelques secondes ou minutes qui suivent la prise de repas sanguin par l'insecte. Par opposi-

tion à la transmission cyclique, la transmission mécanique est caractérisée par le fait qu'il n'y a pas de transformation ni de multiplication du parasite chez le vecteur (Desquesnes and Dia, 2004). Les insectes sont alors comme une seringue qui prélève et réinjecte. Tout insecte hématophage susceptible de piquer successivement plusieurs hôtes, à quelques minutes ou à quelques heures d'intervalle, peut être qualifié de vecteur mécanique (Rodhain and Perez, 1985). Les espèces de trypanosomes les plus connues pour utiliser ce mode de transmission sont : *T. vivax* et *T. evansi* qui sont présentes hors de l'aire de répartition des glossines (Desquesnes and Dia, 2003). Parmi la grande diversité des insectes hématophages, ce sont les Tabanidés et les les Stomoxyinés qui ont été principalement décrits comme étant des acteurs d'importance dans la transmission mécanique des trypanosomes (Desquesnes et al., 2008). Notons cependant que les hippoboscidés sont également soupçonnés de transmettre *T. evansi* (Figure 1.9C) (Desquesnes et al., 2005).

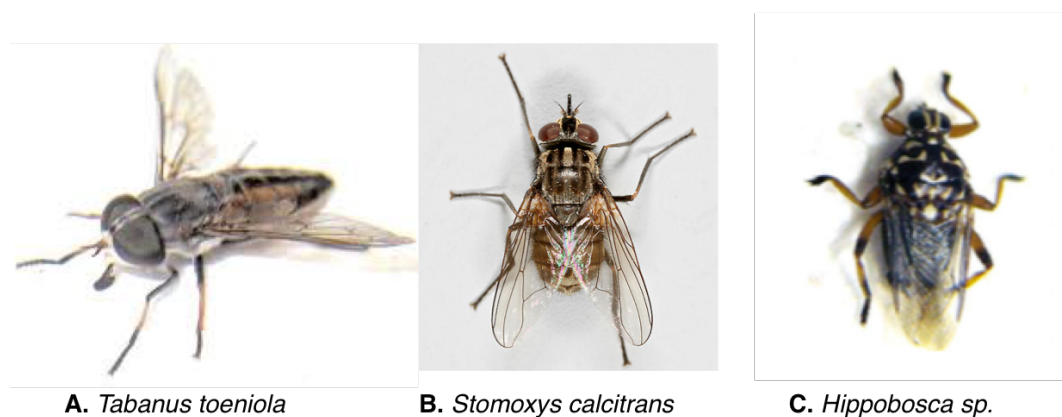


FIGURE 1.9 – Les vecteurs mécaniques de trypanosomes africains. A. Desquesnes et al., (2005) (Desquesnes et al., 2005); B. Gayle and Jeanell Strickland (<https://bugguide.net/node/view/165944/bgref>); C. Desquesnes et al., (2005) (Desquesnes et al., 2005).

1.5.2.1 Tabanidés (taons)

Les Tabanidés sont des diptères comme les glossines. Seules les femelles sont hématophages. Ils constituent une famille de plus de 4000 espèces avec une grande importance médicale et vétérinaire (Itard, 2000). Ils ont une distribution mondiale (Afrique, Amérique latine, Guayane française et Asie) (Desquesnes et al., 2008) et sont très agressifs sur le bétail avec une grande quantité de sang prélevé par piqûre (Figure 1.9A).

1.5.2.2 Stomoxyinés

Les stomoxyinés sont également des diptères, ressemblant plus aux mouches domestiques mais qui possèdent des pièces buccales adaptées à la piqûre. Les deux sexes sont hémato-phages comme chez les glossines. Les Stomoxyinés sont particulièrement abondants dans les régions chaudes et humides soudano-sahéliennes (Figure 1.9B) (Desquesnes et al., 2008).

1.6 Les trypanosomoses animales africaines

Les trypanosomoses animales sont des infections d'une grande importance vétérinaire et représentent un des obstacles majeurs au développement intensif de l'élevage en Afrique Subsaharienne. Ce sont plusieurs maladies hémoparasitaires des animaux incluant la *nagana* provoquée par *T. congolense*, *T. vivax* et *T. b. brucei*, le *surra* par *T. evansi* et enfin la *dourine* par *T. equiperdum*. Nous nous intéressons dans la suite de ce manuscrit plus particulièrement aux infections chez les bovins induites par *T. congolense*, *T. vivax* et *T. b. brucei*. Ces infections chez les bovins sont des maladies anémiantes et débilitantes retrouvées essentiellement dans l'aire de distribution des glossines, vectrices des trypanosomes (Figure 1.8). Elles sont responsables d'une importante perte économique annuelle avec plusieurs millions de têtes de bovins sous risque de contracter la maladie. Un ensemble de signes cliniques est associé à la maladie, l'anémie étant l'un des plus répandus, mais aucun symptôme n'est pathognomonique de la maladie (Tableau 1.1).

1.6.1 Pathogénie

A l'exclusion de *T. equiperdum* qui affecte spécifiquement les équidés, *T. simiae*, *T. godfreyi* et *T. suis* qui infectent surtout les suidés et enfin les deux sous-espèces de *T. brucei* impliquées dans la THA, tous les autres trypanosomes salivaires sont pathogènes pour les bovidés et provoquent la trypanosomose bovine (Tableau 1.1). Diverses espèces animales peuvent être affectées y compris les grands mammifères sauvages africains. Souvent fatale sans un traitement adéquat, les trypanosomoses bovines sont toutefois généralement des maladies évoluant de façon chronique avec une sévérité dépendant de plusieurs facteurs. Les plus déterminants de ces facteurs

TABLE 1.1 – Caractéristiques des trypanosomoses animales africaines (Desquesnes et al., 2013, Taylor and Authié, 2004)

Trypanosomes	Vecteur	Distribution	Maladie	Préférence d'hôtes	Signes cliniques
<i>T. congolense</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne	<i>Nagana</i>	Bovins, petits ruminants (moutons, chèvres), Chevaux, Chiens, Porcs, Sangliers	<ul style="list-style-type: none"> – Anémie*, – pyrexie, – gonflements des ganglions lymphatiques et de la rate, – ataxie, – léthargie, – cachexie*, – œdèmes, – immunosuppression – avortement – symptômes neurologiques
<i>T. vivax</i>	<i>Glossina sp., Tabanidés et stomoxes</i>	Afrique subsaharienne, Amérique Latine		Bovins, Chameaux, petits ruminants (moutons, chèvres), Chevaux, Buffles	
<i>T.b brucei</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Bovins, petits ruminants, Chameaux, Chevaux, Ânes , Chiens, Chats, Porcs, Sangliers	
<i>T. suis, T. godfreyi, T. simiae</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Porcs	
<i>T. evansi</i>	<i>Tabanidés et stomoxes</i>	Afrique subsaharienne, Afrique du Nord, Amérique latine et Asie	<i>Surra</i>	Chameaux, Chevaux , petits ruminants, Chameau de Bactriane , Bovins, Porcs, Chiens et Animaux sauvages (Rhinocéros, Buffles , Chevreuil, Sangliers, Éléphant d'Asie)	
<i>T. equiperdum</i>	<i>Vénérien</i>	Monde entier (excepté USA, Canada et Océanie)	<i>Dourine</i>	Équidés (Chevaux , Ânes et Mulets)	

Les animaux marqués en gras sont les plus affectés par l'espèce de trypanosomes. *signes cliniques majeurs

sont (i) des facteurs liés à l'infection comme l'espèce de trypanosome en présence, le nombre de parasites injectés par le vecteur et enfin le nombre de piqûres infectantes reçues par l'animal, et (ii) d'autres facteurs liés à l'animal et aux systèmes d'élevage, comme le contexte nutritionnel, les maladies interrécurentes, et la diversité génétique de l'animal.

À la suite d'une piqûre de mouche tsé-tsé, il se produit au niveau du site d'inoculation une réaction inflammatoire. La réplication des métatrypanosomes injectés et le gonflement local (dû à l'inflammation) forme ce qu'on appelle un « chancre » d'inoculation. Les trypanosomes s'y multiplient pendant au moins 16 jours avant de se répandre dans les ganglions lymphatiques et la circulation sanguine (Chartier et al., 2000). À la suite de leur expansion, la parasitémie qui apparaît peut atteindre jusqu'à 10^7 trypanosomes par ml pour *T. vivax*, entre 10^5 - 10^6 pour *T. congolense* et entre 10^4 - 10^5 pour *T. b. brucei* donnant une idée de la virulence de ces espèces (Murray, 1989). Une fois l'infection établie, les molécules de VSG sécrétées par les trypanosomes induisent la production d'anticorps anti-VSG. Ces anticorps forment des complexes immuns en se fixant à un grand nombre de parasites pour aboutir ensuite à leur lyse. Les phagocytes mobilisés (notamment les macrophages) pour lutter contre l'infection, éliminent les complexes immuns et présentent des antigènes parasitaires aux lymphocytes. Cet événement constitue la première crise trypanolytique qui marque le début d'une succession de vagues parasitémiques accompagnées d'accès fébriles (température > 40°C) (Murray, 1989, Taylor and Authié, 2004). Ces accès sont dus à des facteurs impliqués dans la réaction inflammatoire (cytokines IL-1, INF- γ , TNF- α et les prostaglandines) et propres à l'hôte (Authié, 2003, Taylor and Authié, 2004). Ces facteurs sont en partie responsables de la pathogénie. Par ailleurs, la trypanolyse induite par les phagocytes provoque la libération des toxines parasitaires nocives dans l'environnement extracellulaire de leur hôte. Ces substances néfastes constituées par des hémolysines et des enzymes (protéases, phospholipases et neuraminidases, etc.) endommagent les membranes des érythrocytes de l'hôte mammifère (Antoine-Moussiaux et al., 2009, Tizard et al., 1978). D'autre part, la fixation des complexes immuns formés en abondance dans le système réticulo-endothélial ou l'adhésion de molécules du trypanosome sur les érythrocytes, les endommagent durablement et contribuent à l'élimination des globules rouges par les cellules du système phago-

cytaire mononucléaire notamment les macrophages. Cette destruction des globules rouges produit une diminution de la valeur de l'hématocrite (pourcentage du volume des globules rouges dans le sang). Cette valeur, normalement supérieure à 30%, peut chuter jusqu'à 15-20% révélant une importante anémie qui est la caractéristique principale de la maladie (Taylor and Authié, 2004). Au niveau physiologique, en plus de l'anémie, d'autres signes peuvent être observés notamment : l'hypocomplémentémie (réduction de la fraction C3 du complément), la réduction du taux d'hormones et la carence ou la diminution de la concentration sanguine en certaines nutriments (glucose, pyruvate, acides aminés, cholestérol) (Deschamps et al., 2016, Traore-Leroux et al., 1987).

Il existe plusieurs modes d'évolution de la maladie en fonction de l'espèce de trypanosomes. Elle peut être aiguë, avec la mort de l'animal survenant en 3-4 semaines, ou chronique avec une évolution sur des mois, voire des années (Bengaly et al., 2002). Ce ci n'est pas valable pour toutes les races bovines et peut aussi dépendre des conditions d'élevage. En effet, certains animaux ont la capacité de contenir l'infection avec une bonne gestion de l'anémie. Ces animaux sont dits « trypanotolérants » et arrivent même à guérir de la maladie à l'inverse des animaux sensibles à l'infection dits « trypanosensibles ».

1.6.2 Le concept de trypanotolérance

1.6.2.1 Généralités sur la trypanotolérance

La trypanotolérance se définit comme étant l'aptitude de certaines races bovines à limiter la multiplication du parasite et à résister aux effets pathogènes de l'infection. En termes simples, c'est la capacité des bovins à tolérer la maladie en zones infestées par les glossines (Murray et al., 2004). Ce processus semble résulter d'une sélection naturelle sous une forte et constante pression glossinienne et parasitaire pendant des millénaires. La trypanotolérance a été acquise par les races bovines qui ont co-évolué avec les trypanosomes africains. En effet, plusieurs auteurs ont observé que le niveau de cette tolérance aux trypanosomes serait à mettre en relation avec l'ancienneté de l'introduction des races bovines en Afrique (Authié, 1994, Hanotte et al., 2002). En Afrique on rencontre deux groupes principaux de bovins domestiques : Les

Zébus (*Bos indicus*) et les Taurins (*Bos taurus*), mais également leurs « croisements » (Payne and Hodges, 1997). Les premiers sont de grande taille, sont caractérisés par la présence d'une bosse et sont sensibles aux trypanosomoses. Les seconds, les taurins, sont quant à eux de plus petite taille, sans bosse et constituent les bovins au sein desquels on trouve des races trypanotolérantes. A noter que tous les zébus africains ont une part du génome d'origine taurine, leurs haplotypes mitochondriaux étant taurins (Bradley et al., 1996, MacHugh et al., 1997). La présence des Zébus, domestiqués dans la vallée de l'Indus, remonterait à 4000 ans en Afrique de l'Est, mais leur migration vers l'Afrique de l'Ouest ne daterait que du premier millénaire (700 après J.C.) lors des invasions arabes (Hanotte et al., 2002, Mwai et al., 2015). L'arrivée des taurins originaires du Proche-Orient, remonterait à plus de 5000 ans soit (3000 avant J.C.) (Mwai et al., 2015). Les taurins sont passés par l'Égypte avant de rejoindre l'Afrique de l'Ouest où ils se sont établis et sont rentrés en contact, des siècles avant les zébus, avec la mouche tsé-tsé et les trypanosomes déjà présents (Authié, 1994, Hanotte et al., 2002). Ce serait donc une pression de sélection due à cette exposition prolongée aux glossines et aux trypanosomes qui aurait conduit au développement de cette capacité des taurins à mieux contenir l'infection et la pathologie dues aux trypanosomes. Cette hypothèse est vérifiable par le fait que les races taurines européennes sont très sensibles à l'infection aux trypanosomes. Il faut cependant noter d'importantes variations du degré de sensibilité ou de tolérance respectivement chez les zébus et chez les taurins, selon les races, selon les individus, et selon les conditions d'élevage (Roelants et al., 1983). Par ailleurs, les croisements qui sont opérés entre bovins trypanosensibles et trypanotolérants, à cause de la préférence des éleveurs pour le gabarit plus imposant des Zébus et de leur souhait de garder la robustesse des taurins, aboutissent à une tolérance intermédiaire des animaux métis (Berthier et al., 2015, Leak et al., 1993). Le phénotype trypanotolérant est un trait multigénique et multifactoriel (Hanotte et al., 2003, Van der Waaij et al., 2003).

1.6.2.2 La biologie de la trypanotolérance

Trois critères caractérisent la trypanotolérance chez les bovins : la capacité à réguler la parasitémie, une bonne aptitude à contrôler l'anémie au cours de l'infection aux trypanosomes et une forte immunoréaction (Murray and Dexter, 1988, Naessens,

2006, O’Gorman et al., 2006). Ainsi, l’animal trypanotolérant s’oppose à la fois à l’établissement du parasite et aux effets pathologiques dus à l’infection. Au niveau phénotypique, la différence entre un animal trypanotolérant et trypanosensible a été bien décrite dans plusieurs études (Authié, 1994, Berthier et al., 2015, O’Gorman et al., 2009, Van der Waaij et al., 2003). En général, tous les animaux présentent une baisse de l’hématocrite, qui débute quelques jours après l’infection, mais, alors que l’hématocrite des taurins de race trypanotolérante remonte progressivement, les zébus trypanosusceptibles présentent une anémie beaucoup plus prononcée et durable. La période prépatente et le niveau du pic de parasitémie sont similaires entre animaux tolérants et sensibles, mais les animaux tolérants présentent une décroissance rapide des vagues parasitémiques par rapport aux animaux sensibles. Une leucocytose (en particulier en lymphocytes B) a également été observée chez les bovins trypanotolérants (Berthier et al., 2015, O’Gorman et al., 2009).

Côté moléculaire, tous les mécanismes impliqués n’ont pas été complètement élucidés. On peut cependant noter plusieurs observations au niveau transcriptomique. Berthier et al., (2003) ont montré que l’expression de plus de 187 gènes de bovins était modifiée dans un contexte d’infection avec *T. congolense*. Certains gènes étaient plus activés que d’autres. Et parmi ces gènes activés ont été retrouvés essentiellement des gènes impliqués dans les mécanismes immunitaires, dont des gènes codant pour différentes chaînes de molécules des immunoglobulines (IgG et IgM) (Berthier et al., 2003). L’étude du profilage des cytokines a montré que les niveaux de transcription des gènes codant pour les médiateurs pro-inflammatoires (IFNG, IL1A, TNF et IL12) ont augmenté chez les N’Dama trypanotolérants à 14 jours post-infection par rapport aux niveaux de pré-infection. Chez les bovins trypanosusceptibles, un environnement de cytokines analogue à celui des cellules T auxiliaires de type 2 (TH2) était prédominant au pic de la parasitémie avec des augmentations des transcriptions pour les gènes IL6 et IL10 (O’Gorman et al., 2006).

D’autres part, il a été observé que les bovins trypanosusceptibles, plus précisément les bovins, avaient une altération de la réponse des cellules T induisant un défaut de commutation isotypique des IgM aux IgG dans un contexte d’infection (Authié et al., 1993, Mansfield, 1994). Enfin, une protéine immunogène majeure d’une taille de

33 kDa chez *T. congolense* a été identifiée par Authié (1993) avec la caractéristique d'induire une réponse anticorps spécifique et très élevée (en IgG) chez les bovins N'Damas en comparaison avec celle des bovins Borans infectés par *T. congolense*. La réponse sérologique contre cette protéine, appelée par la suite « congopaine », a été proposée comme marqueur spécifique de la tolérance de bovins trypanotolérants (Authié, 1994). En sus de ces observations et hypothèses, plusieurs études sont en cours pour mieux élucider les rôles d'autres protéines dans la trypanotolérance.

1.6.3 Les signes cliniques

Les trypanosomoses animales notamment bovines sont des maladies anémiantes et débilitantes comme décrites précédemment. Les symptômes sont plus sévères chez les races bovines trypanosensibles essentiellement les Zébus et les Taurins européens. Les signes cliniques ne sont pas pathognomoniques et peuvent souvent être confondus avec les symptômes d'autres hémoparasitoses (Babesioses, Theilerioses), infections bactériennes (Anaplasmoses) et helminthoses. La maladie peut évoluer selon plusieurs modes allant d'une infection aiguë le plus souvent mortelle en quelques semaines, à une infection chronique qui s'installe sur la durée (plusieurs mois ou années). Le signe clinique majeur de la maladie est l'anémie. Toutefois, selon la phase d'évolution, on peut distinguer des signes différents. Ainsi, une hypertrophie des ganglions lymphatiques et de la rate, une faiblesse, une léthargie, une dégradation de l'état général, associée à une cachexie, des avortements et une réduction de la production de lait et de viande sont observés dans la phase aiguë, accompagnée souvent de lésions tissulaires. Sans traitement, la mort de l'animal peut survenir au bout de trois à quatre semaines (Taylor and Authié, 2004). Dans certains cas, l'état de l'animal peut se stabiliser et il peut guérir de la maladie après une longue période de convalescence. Dans le cas d'une évolution chronique (caractérisée par des parasitémies intermittentes) un retard de croissance, une émaciation et une stérilité sont observés (Bengaly et al., 2002). Dans cette phase chronique, l'animal peut également mourir d'une insuffisance cardiaque congestive à la suite d'une anémie prolongée, de lésions myocardiques et d'une perméabilité vasculaire accrue (Taylor and Authié, 2004).

1.6.4 Épidémiologie

La répartition de la *nagana* suit la distribution des glossines en Afrique (Figure 1.8). Selon les dernières informations de la FAO (2020) sur l'état des trypanosomoses animales, plus de 10 millions de Km² de superficie en Afrique Subsaharienne sont infestés par les glossines. Cette superficie couvre un ensemble de 38 pays avec plus de 55 millions de bovins (sans compter les ruminants) soumis au risque d'infections par les trypanosomes (FAO, 2020). La plupart des animaux, domestiques, mais aussi sauvages, sont affectés à des degrés divers par la *nagana*. La préférence d'hôtes est fonction de l'espèce de trypanosomes (Tableau 1.1). *T. congolense*, *T. vivax* et *T. b. brucei* ont une large gamme d'hôtes parmi les animaux domestiques (bovins, chevaux, moutons, chèvres, porcs et chiens). Bien que le porc puisse être infecté par toutes les espèces de trypanosomes, il est surtout sensible à *T. simiae*, *T. godfreyi* et *T. suis* (Giordani et al., 2016, OIE, 2018a,b,c). La faune sauvage, également infectée, joue le plus probablement un rôle de réservoir du fait de leur tolérance aux infections de trypanosomes. D'un point de vue pathogénique, l'espèce *T. congolense* est le trypanosome le plus pathogène chez les bovins mais c'est l'espèce *T. vivax* qui est la plus répandue du fait de son mode de transmission qui peut être mécanique ou cyclique.

1.6.5 Importance socio-économique

La croissance fulgurante de la population humaine en Afrique ne cesse d'être un sujet de discussion interpellant les organismes internationaux. Après le forum de la FAO en 2009 sur « Comment nourrir le monde en 2050 », il a été estimé que la population africaine devrait atteindre 1,5 à 2 milliards en 2050. En même temps, la production agricole ne suit pas la croissance démographique. En termes de capacité du continent à nourrir ces populations, une problématique réelle se pose. Par exemple, la production de viande de bétail par hectare est 7 et 70 fois inférieure à celle d'Amérique du Sud et de l'Europe respectivement. La production de viande bovine en Afrique ne représente que 5% de la production de la planète. Cette production ne correspond qu'à la consommation pour 15% de la population mondiale alors que la population africaine représente actuellement 17%. Environ 20% de la viande consommée en Afrique est importé. Ce qui est très élevé comparé à la moyenne mondiale de 10% (Chalmin et al., 2019). Cet écart indéniable entre les continents est en grande partie lié aux

pertes animales dues aux maladies du bétail dont les trypanosomoses. Ces dernières sont responsables de la détérioration de l'état général des animaux, associée à une forte mortalité, une réduction drastique de la puissance de traction des animaux, et de la production de viande et de lait. Il a été estimé que près de trois millions de bovins meurent de la TAA, et 35 millions de doses de trypanocides sont administrées en Afrique subsaharienne chaque année (FAO, 2020). Les pertes économiques sont estimées à 4,75 milliards de dollars américains par an avec plus d'un milliard pour la production bovine (Kristjanson et al., 1999). A titre d'exemple, un total de 518,9 et 58,8 millions de dollars américains ont été estimés respectivement comme des pertes annuelles directes et indirectes liées à la *nagana* au Nigeria (Odeniran et al., 2021).

Malgré ces incidences socio-économiques importantes, les essais de développement d'un vaccin conventionnel contre les trypanosomoses ne se sont pas révélés prometteurs, en particulier chez les bovins. Le contrôle de la maladie repose essentiellement sur trois piliers parmi lesquels la lutte anti-vectorielle, la chimiothérapie et le diagnostic actif. Ce dernier constitue même une étape indispensable pour la détection des parasites et devrait être un préalable à toutes décisions que cela concerne le traitement, la lutte ou l'utilisation de bétail trypanotolérant en zone de forte endémie. Dans le prochain chapitre, les différentes stratégies existantes pour lutter contre les trypanosomes et, plus en détails, les différentes techniques et tests de diagnostic seront abordés.

2 | Stratégies de lutte et méthodes de diagnostic de la trypanosomose animale africaine

2.1 Méthodes de lutte contre les trypanosomoses animales

L'importance socio-économique des trypanosomoses animales africaines (TAA), bien qu'elle soit difficile à évaluer sur l'entièreté du continent Africain, n'est plus à démontrer (Kristjanson et al., 1999, Odeniran et al., 2021, Shaw, 2009). Pour limiter leur incidence sur l'élevage africain déjà éprouvé, un contrôle de ces maladies est indispensable. Les moyens de lutte contre les TAA s'articulent sur les acteurs du cycle épidémiologique de la maladie. En effet, les trypanosomoses impliquent trois protagonistes (le parasite, le vecteur et l'hôte vertébré) cibles des méthodes de lutte employées. Actuellement et en excluant l'approche vaccinale qui demeure inefficace chez les bovins, diverses méthodes de lutte existent. Les plus employées sont l'utilisation des trypanocides pour la chimiothérapie et la chimioprophylaxie, les approches visant à éradiquer/contrôler localement les vecteurs, la promotion ou l'élevage du bétail trypanotolérant. Et pour renforcer l'efficacité de la lutte, plusieurs de ces techniques sont souvent combinées pour une lutte dite intégrée.

2.1.1 L'approche vaccinale

La vaccination consiste à induire une immunité secondaire plus ou moins protectrice contre un agent infectieux. Dans toutes les trypanosomoses, la lutte vaccinale aurait constitué la stratégie présentant le plus d'avantages en termes de rapport coût/efficacité. Au premier abord, elle semblait être une stratégie accessible. En effet, dans plusieurs études, il a été rapporté qu'en plus de la capacité des animaux

trypanotolérants à moduler l'infection par les trypanosomes, certaines infections trypanosomiennes chez l'homme seraient contrôlées grâce à une réponse immunitaire efficace (Garcia et al., 2000, Ilboudo et al., 2014, Jamonneau et al., 2012). Ces observations suggéraient qu'une immunisation appropriée de l'hôte mammifère suffirait à elle seule pour protéger l'hôte des trypanosomoses. De plus, les avancées vers le développement de vaccins anti-parasitaires notamment contre *Taenia ovis*, *Echinococcus granulosus* et *Boophilus microplus* (Dalton and Mulcahy, 2001) et plus récemment contre la leishmaniose viscérale de chiens (Petitdidier et al., 2019) confortaient l'idée de développement de l'approche vaccinale contre les trypanosomes. Toutefois, aucun vaccin anti-trypanosome n'a abouti, bien que la mise en œuvre de l'approche vaccinale reste un objectif important. Même si l'antigène majoritaire de trypanosomes reste la VSG dont l'utilisation n'est pas souhaitable pour cette approche du fait de sa haute variabilité, plusieurs antigènes invariants ont été évalués.

Les protéines de la poche flagellaire de *T. brucei rhodesiense* sont parmi les premiers antigènes testés. Mkunza et al. (1995) ont montré que la protection contre la TAA conférée aux troupeaux d'élevage à la suite de l'inoculation des antigènes de la poche flagellaire était meilleure que celle conférée par la chimioprophylaxie avec l'isométabidium chloride (Mkunza et al., 1995). D'autres antigènes notamment les protéines du cytosquelette (tubulines, actine, la protéine MAP p15 pour microtubule associated protein 15) ont également été proposés comme candidats vaccins pour tous les trypanosomes pathogènes (Tableau 2.1). Lubega et al (2002) ont montré qu'une tubuline repliée de *T. b brucei* protégeait jusqu'à 70% des souris contre une infection à *T. congolense* et à *T. b rhodesiense* (Lubega et al., 2002). Des souris immunisées à partir de l'orthologue de la tubuline chez *T. evansi* (la β -tubuline) associée à l'actine avaient également acquis une immunité contre les infections à *T. evansi*; *T. equiperdum* et *T. b brucei* (Tableau 2.1) (Li et al., 2009). Cependant, pour tous ces antigènes testés, l'immunité observée était temporaire et l'efficacité de la protection conférée était conditionnée à une charge parasitaire de faible ampleur (Baral, 2010, La Greca and Magez, 2011, Lubega et al., 2002).

TABLE 2.1 – Résumé des candidats vaccins rapportés dans la littérature (La Greca and Magez, 2011, Magez et al., 2020).

Type of vaccine	Antigen	Antigen preparation	Boosts/host	Time gap boost-challenge	Parasite load	Outcome
Intra-muscular	<i>T. b. rhodesiense</i> FP	Parasite isolated	3/cattle	14 days or more	Natural exposure	Partial protection
I.p.	<i>T. b. brucei</i> AnTaR FP	Parasite isolated	3/mouse (Balb/c)	3 weeks	500–10 ³	Partial/no protection
I.p.	<i>T. b. brucei</i> MITat ISG65, ISG75	Recombinant protein	3/mouse (C57bl/6)	11 days	10 ⁴	No protection
I.p.	<i>T. b. brucei</i> ISG75	Plasmid DNA	1/mouse (Balb/c)	175 days	500	Partial protection
I.p.	<i>T. b. brucei</i> GuTat10.0 Ca ²⁺ ATPase TBCA2	Recombinant protein	3/mouse (Balb/c)	6 weeks	10 ⁶	No protection
Sub-cutaneous	<i>T. brucei</i> (UTRO010291B) Tubulin rich fraction	Parasite isolated	3/mouse (no strain indication)	Not indicated	10 ³ -10 ⁵	Partial (cross-species) protection
Sub-cutaneous	<i>T. evansi</i> (STIB806) b-Tubulin	Recombinant protein	3/mouse (Balb/c)	6 days	10 ³	Partial (cross-species) protection
Intra-muscular	<i>T. evansi</i> (EU483116) β-Tubulin	Plasmid DNA	2/mouse (Swiss albino)	35 days	10 ³	No protection
Sub-cutaneous	<i>T. evansi</i> (EU483116) β-Tubulin	Recombinant protein	2/mouse (Swiss albino)	14 days	10 ³	No protection
Sub-cutaneous	<i>T. evansi</i> (STIB806) Actin	Recombinant protein	3/mouse (Balb/c)	6 days	10 ³	Partial (cross-species) protection
Sub-cutaneous	<i>T. congolense</i> CP1 & CP2	Recombinant protein	4/cattle (Boran)	1 month	Tsetse bite	Improved recovery
Intra-muscular	<i>T. b. brucei</i> Sialidase	Plasmid DNA	1/mouse (Balb/c)	175 days	500	Partial protection
I.p.	<i>T. congolense</i> Sialidase	Recombinant protein	4/mouse (Balb/c)	10–14 days	10 ⁴	Partial protection
I.p.	<i>T. b. brucei</i> AnTaR GPI	GPI-Liposomes	2/mice (C57bl/6 and KOs)	3 weeks	5 × 10 ³	Cross-species anti-pathology

I.p., intraperitoneal; FP, Flagellar Pocket; ISG, Invariant Surface Glycoprotein; GPI, glycosylphosphatidylinositol; CP, Cystein protease.

La protéine MAP p15 de *T. brucei*, quant-à-elle, fournissait une protection allant jusqu'à 100% aux souris infectées avec une souche hétérologue de la même espèce (Rasooly and Balaban, 2004). Avec un résultat comparable à MAP p15, les protéines de la tige paraflagellaire impliquées dans l'attachement du flagelle conféraient également une protection de 100% aux souris contre une infection de *T. cruzi* et réduisait la parasitémie de 90% (Tableau 2.1) (Wrightsmann and Manning, 2000).

Dans la liste des autres protéines parasitaires étudiées comme potentielles cibles de vaccination, on peut citer : les sialidases, l'ancre GPI (glycosyl-inositol-phosphate) des VSG et enfin la congopaïne (de *T. congolense*) (Tableau 2.1). Comme précédemment décrite, la congopaïne est une cystéine protéase impliquée dans la pathogénicité de la trypanosomose (Authié et al., 1993), contre laquelle la réponse IgG des bovins trypanotolérants est forte, alors que celle de bovins trypanosusceptibles est réduite. Pour la recherche vaccinale, son évaluation a montré qu'elle ne jouait aucun rôle de protection dans la phase précoce de la maladie (Authié et al., 2001). Les bovins immunisés avec deux parties « recombinantes » de la congopaïne ne présentaient pas de différence notable comparés aux bovins contrôles, à la différence de son orthologue chez *T. cruzi*, cruzaine, qui a montré une haute potentielle de protection dans des nombreuses études (Cazorla et al., 2009, Duschak and Couto, 2009, Laderach et al., 1996). Toutefois, il a été observé, en conditions expérimentales, que les bovins immunisés présentaient un hémocrite élevé et une reprise de poids (ou pas de perte de poids) deux à trois mois après l'infection, contrairement aux bovins non immunisés (Authié et al., 2001). Les essais sur des bovins infectés naturellement en zone de forte incidence n'ont pas montré de résultats encourageants (Thévenon, communication personnelle). La dernière étude d'essai vaccinal à noter est celle d'Autheman et al. (2021). Dans cette étude l'efficacité d'un candidat vaccin (basé sur une protéine invariante de flagelle) a clairement été mise en évidence chez la souris contre l'infection à *T. vivax* (Autheman et al., 2021). Cette étude constitue un espoir dans la recherche vaccinale contre la TAA.

Finalement, malgré la panoplie des antigènes évalués aucun vaccin n'a encore vu le jour pour les trypanosomoses (humaine ou animale). Et pourtant, les résultats des différents tests chez les murins étaient et sont encore encourageants aujourd'hui. La

problématique majeure est le phénomène de variation antigénique, comme évoqué plus haut dans ce manuscrit, masquant les autres antigènes (dont les protéines invariantes de surface) et donnant aux trypanosomes la capacité d'échapper au système immunitaire de leur hôte. Par ailleurs, aucun essai chez les murins, qui pour la plupart sont des lignées consanguines de laboratoire, ne permet de faire le lien avec la réponse immunitaire engendrée chez un hôte naturel du trypanosome. Ainsi, en attendant un éventuel vaccin contre les trypanosomoses et en particulier contre la TAA, les stratégies de lutte se fondent sur les méthodes que je vais présenter dans les paragraphes suivants.

2.1.2 Chimio prophylaxie et chimiothérapie

L'utilisation des trypanocides joue un rôle crucial dans le contrôle des trypanosomoses en absence de vaccin. Entrant dans le processus du contrôle du réservoir animal des parasites, la chimiothérapie et la chimio prophylaxie des animaux permettent de réduire le risque de propagation de la maladie à l'échelle du troupeau. Trois molécules de trypanocides sont essentiellement employées dans le contrôle de la TAA : le chlorure d'isoméamidium (ISM, exemple du Veridium®), l'Acéturate de Diminazène (AD, exemple du Veriben®) et les sels d'homidium (Figure 2.1) (Steverding, 2010).

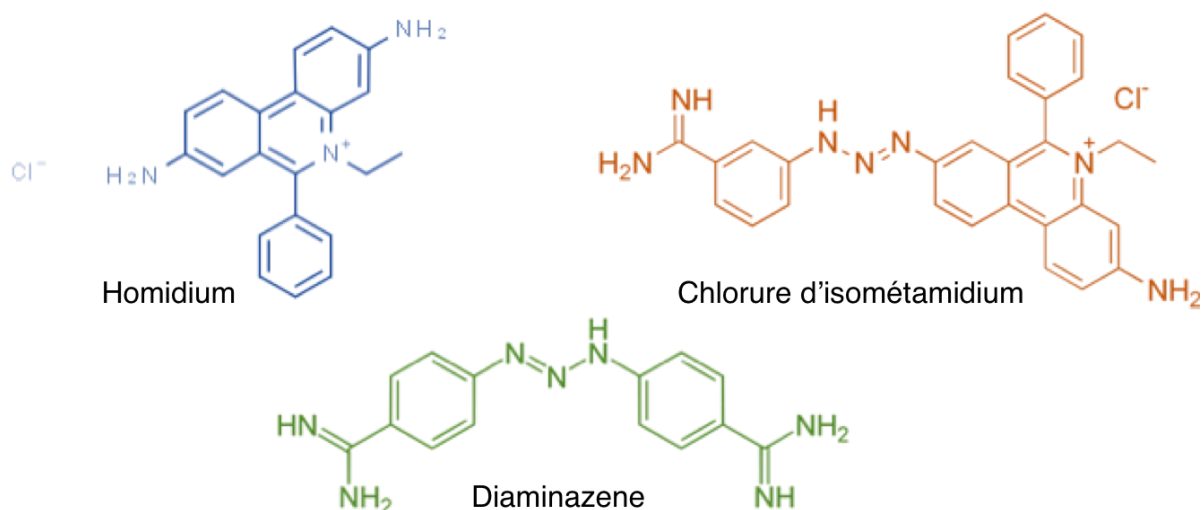


FIGURE 2.1 – Structures chimiques des trois principales molécules utilisées en chimiothérapie et chimio prophylaxie de la trypanosomose animale africaine (Giordani et al., 2016).

Dans les années 2000, certains auteurs estimaient à 44% la part des trypanocides

dans le marché total des médicaments vétérinaires en Afrique Subsaharienne. Dans cette proportion, l'ISM, l'AD et l'homidium représentaient respectivement 40%, 30% et 26% du marché total de trypanocides et avec une valeur estimée à plus de 15 millions d'euros (Sutcliffe et al., 2014).

Les mécanismes d'action de ces trypanocides ne sont pas tous complètement élucidés. Toutefois, quelques cibles ont été identifiées. Les deux premiers trypanocides, l'ISM et l'AD, ciblent l'ADN du kinetoplaste et l'homidium interfère avec les fonctions glycosomales, le métabolisme du trypanothione et la réplication des minicercles du kinetoplaste (Holmes et al., 2004). En ce qui concerne leur emploi, le chlorure d'isoméamidium est surtout utilisé comme prophylaxie. Il a été montré qu'il permettait une protection sur six mois en moyenne. L'homidium est quant-à-lui employé à la fois pour la prophylaxie (de courte durée) et pour le traitement. L'acéturate de diminazène est principalement employé à des fins thérapeutiques (Anene et al., 2001). Ces trois molécules sont indiquées dans une infection à *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei* (Giordani et al., 2016).

Malgré les nombreuses doses de trypanocides utilisées annuellement en Afrique subsaharienne, 35 millions selon la FAO (FAO, 2020), l'efficacité de la chimiothérapie ou de la chimioprophylaxie reste peu satisfaisante. En effet, l'utilisation abusive de traitements, les problèmes de sous-dosage, l'utilisation de produits trypanocides contrefaits (favorisés par les marchés alimentaires informels et les vendeurs de rue) sont responsables du développement de la résistance des trypanosomes aux médicaments, phénomène de plus en plus rapporté dans les pays africains (Bengaly et al., 2018). Cette émergence de la chimiorésistance rend nécessaire le développement des nouvelles molécules aussi bien que la formation des éleveurs aux bonnes pratiques de l'usage des trypanocides. Par ailleurs, la molécule de l'homidium n'est plus conseillée aux utilisateurs du fait de son effet mutagène révélé (Sutcliffe et al., 2014). D'autre part, les molécules sont fournies essentiellement par les compagnies européennes. La non-rentabilité du développement d'un nouveau trypanocide pousse beaucoup de ces compagnies pharmaceutiques à ignorer cette problématique. En effet, il a été estimé que le coût du développement d'un seul composé pouvait s'élever à 250 millions de dollars américains alors que le marché global de molécules actuelles est de 30 millions

de dollars (Delespaux et al., 2008). Même si des nouvelles cibles thérapeutiques ont été identifiées, entre autres les enzymes glycolytiques, les enzymes du métabolisme du trypanothione, les cystéines peptidases etc. (Balogun et al., 2013, Spinks et al., 2009, Verlinde et al., 2001), et que des essais pour développer de nouveaux traitements existent, l'utilisation rationnelle de trypanocides et celle des autres méthodes de lutte comme la lutte anti-vectorielle doivent être privilégiées.

2.1.3 Élevage d'animaux trypanotolérants

Cette stratégie constitue une bonne alternative pour limiter les effets de la TAA. La promotion des animaux trypanotolérants dans des bonnes conditions d'élevage a déjà fait ces preuves. Des essais, menés avec des animaux trypanotolérants dans des régions de faible ou moyen risque d'infection aux trypanosomes, ont démontré la réelle capacité de ces animaux à rester productifs, quelles que soient les conditions (D'leteren et al., 1998). Une baisse d'utilisation des trypanocides a été observée grâce à l'application de cette stratégie d'élevage. Cependant, il faut noter que cette approche rencontre quelques contraintes majeures comme le degré de trypanotolérance des races qui est très variable et dont la manifestation dépend de plusieurs paramètres. Ces derniers sont les conditions d'élevage, la pression vectorielle et parasitaire et le degré de pureté des races (aucune race n'est réellement « pure » en Afrique). Il n'existe pas à l'heure actuelle de marqueurs génétiques pour l'identification et la sélection des animaux trypanotolérants, autres que les critères phénotypiques définissant les races. Par ailleurs le pourcentage de bovins trypanotolérants par rapport aux trypanosusceptibles est assez faible, environ 5% en Afrique subsaharienne (Rege, 1999), et le métissage anarchique est dans le même temps responsable de la perte de « pureté » de ces races et de la diminution/dilution du caractère trypanotolérant (Ouédraogo et al., 2020). En outre, près de 16% des bovins trypanotolérants sont menacés de disparition (Rege, 1999), car les éleveurs ont tendance à préférer les zébus, jugés plus productifs car de plus gros gabarit, dès que la pression trypanosomienne baisse ou peut être contrôlée par les médicaments trypanocides (Bouyer et al., 2015).

2.1.4 Lutte antivectorielle

Les glossines ou mouches tsé-tsé sont à la fois vecteurs et réservoirs de trypanosomes (Solano et al., 2018). La lutte antivectorielle permet de réduire la transmission des trypanosomes par la réduction de la densité de mouches et, par la même occasion, d'éliminer une partie du réservoir de la TAA. Cette stratégie prend tout son sens avec l'absence de vaccin et les difficultés liés aux autres méthodes de lutte contre la TAA. Certains auteurs la considèrent comme la voie la plus durable pour l'élimination des trypanosomoses (Bouyer et al., 2010). La lutte antivectorielle regroupe plusieurs méthodes à la fois directes et indirectes. Les premières techniques utilisées ont été l'éclaircissement forestier et l'abattage d'hôtes nourriciers sauvages. Ces techniques ont connu du succès en leurs temps mais ont, malgré tout, été abandonnées dans les années soixante-dix notamment à cause des conséquences écologiques néfastes (Solano et al., 2018). Les méthodes agissant directement sur les mouches incluent principalement l'utilisation d'insecticides et la lutte biologique. Les insecticides sont utilisés de plusieurs manières. Employés en épandage, les insecticides à longue rémanence (DDT, dieldrine) étaient d'abord pulvérisés en solution aqueuse sur les lieux de repos des glossines. À cause de son coût élevé, de sa mise en place souvent pénible et de son impact néfaste sur l'environnement, cette technique a progressivement laissé place à l'épandage aérien d'insecticides non-résiduels (endosulfan) dont l'utilisation est souvent suivie de l'emploi des pièges et écrans imprégnés de pyréthrianoïdes de synthèse. Ces méthodes sont plus acceptables sur le plan éco-toxicologique. Toutefois, le coût de l'épandage aérien reste élevé et l'efficacité de pièges à glossines peut varier considérablement (Bouyer et al., 2009, Solano et al., 2018, Vreysen et al., 2013). La dernière méthode impliquant les insecticides consiste en leur application sur le bétail. C'est la méthode la moins coûteuse mais elle ne fonctionne pas bien dans les zones fortement infestées.

Enfin, lorsque la densité glossinienne est significativement réduite à la suite de l'emploi de méthodes précédemment décrites dans des zones isolées et épargnées de ré-invasion, la technique de l'insecte stérile est utilisée pour éradiquer les glossines « par lâché des mâles stériles ». C'est la méthode biologique la plus utilisée. Elle est basée sur le fait que les mouches femelles n'acceptent en principe qu'un seul accouplement.

Si cet accouplement est réalisé avec un mâle stérile, la femelle ne produira jamais de progéniture (Solano et al., 2018). C'est une technique spécifique et non polluante. Les glossines mâles sont stérilisées de façon chimique ou par radiation ionisante (rayons X) avant leur lâché en grand nombre. Elle a permis l'élimination de tsé-tsé sur l'île de Zanzibar et est en cours d'utilisation au Sénégal depuis 2013 (Solano et al., 2018). Toutefois, la nécessité d'une production en masse et l'utilisation de la radioactivité rendent difficile sa mise en oeuvre et son efficacité n'est pas immédiate (Bouyer et al., 2009, Solano et al., 2018, Vreysen et al., 2013). Ainsi, malgré le financement conséquent de l'Union Africaine depuis les années deux milles dans le programme PATTEC (Pan-African Tsetse and Trypanosomosis Eradication Campaign), il n'en demeure pas moins que, selon les données actuelles, 10 millions de Km² de superficie sont toujours infestés par les glossines en Afrique subsaharienne. Ceci met en évidence la nécessité d'une lutte plus intégrée alliant une chimiothérapie adéquate précédée d'un dépistage soutenu et plus précis comme c'est le cas dans la THA, associée à une lutte anti-vectorielle pour réduire la transmission.

2.2 Méthodes de diagnostic

La détection des parasites est la première étape pour poser un diagnostic de la trypanosomose ou pour estimer la prévalence de la maladie sur le terrain. C'est un élément indispensable dans la gestion de la maladie, tant au niveau des soins individuels (facilitant la prise des décisions de traitement des populations) que des méthodes de lutte employées contre la maladie (enquêtes épidémiologiques permettant l'évaluation de l'efficacité des mesures de contrôles utilisées). De plus, le diagnostic est également un point de contrôle pour les mouvements d'animaux, voire pour la politique d'abattage d'animaux infectés.

Un test de diagnostic idéal doit être simple, rapide, très sensible et spécifique, c'est-à-dire être capable de différencier les parasites étroitement apparentés, en particulier si les syndromes des maladies qu'ils provoquent nécessitent des approches de gestion différentes. Il doit également être adapté à une application sur le terrain et son coût doit être raisonnable. En d'autres termes, il doit remplir un cahier des charges dont les critères sont définis par le terme ASSURED : «Affordable by those at risk of

infection, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, Delivered to those who need it» (en français, abordable par les personnes à risque d'infection, sensible, spécifique, facile d'utilisation, rapide, sans équipement, accessible/administré à ceux qui en ont besoin) (Mabey et al., 2004, Peeling and Mabey, 2014). Avec les avancées technologiques, ces critères sont redéfinis par les termes REASSURED (Real-time connectivity, Ease of specimen collection, ASSURED), qui en plus des critères ASSURED doivent répondre à une connectivité en temps réel et une facilité de collecte des échantillons (Land et al., 2019).

Le diagnostic des trypanosomoses est basé à la fois sur l'observation des symptômes (clinique) et sur l'utilisation de techniques de laboratoire reposant sur deux principes : la détection du parasite lui-même (parasitologie) ou de ses constituants (moléculaire : ADN, ARN ou protéines), et la détection de la réponse immunitaire de l'hôte dirigée contre le parasite (sérologie). Cette thèse ayant porté essentiellement sur le développement de test de diagnostic, je traiterai dans cette section des limites et des avantages de l'ensemble des méthodes diagnostiques actuelles des trypanosomoses animales.

2.2.1 Diagnostic clinique

Les signes cliniques (Tableau 1.1) sont les premiers soupçons d'infection par des trypanosomes chez les bovins. Cependant, aucun n'est pathognomonique car ils sont partagés avec ceux induits par d'autres maladies. On a recours au diagnostic clinique uniquement pour constater l'état physique de l'animal et parce que c'est souvent le seul moyen disponible sur le terrain (Eisler et al., 2004). Toutefois, en présence de glossines dans ces zones endémiques de la maladie, on accorde plus de crédit aux infections trypanosomiennes qu'aux autres maladies lorsque des signes tels que faiblesse, amaigrissement, perte d'appétit, pétéchies conjonctivales ou avortement sont observés.

2.2.2 Examens parasitologiques

Les techniques de diagnostic parasitologique sont basées sur le principe de mise en évidence des parasites dans un liquide biologique de l'hôte. Le diagnostic peut

porter sur différents prélèvements biologiques dont le sang, le liquide œdémateux, le liquide céphalo-rachidien, les biopsies de ganglions lymphatiques ou encore les sécrétions génitales pour ce qui concerne la *dourine* (Uilenberg, 1998).

2.2.2.1 Examens microscopiques directs

Ces examens sont surtout efficaces pendant la phase aiguë de la maladie au cours de laquelle la parasitémie est élevée. Les examens microscopiques directs consistent à rechercher les parasites soit directement dans une goutte de sang frais entre la lame et la lamelle (le plus souvent) soit après enrichissement. Différentes préparations peuvent être réalisées pour l'observation au microscope optique à un grossissement de 400 fois (Büscher et al., 2019, Uilenberg, 1998). La préparation d'un état frais (goutte de sang) déposé sur lame permet bien souvent l'identification des espèces de trypanosomes par l'examen de leur taille et de leurs mouvements. En effet, *T. congolense* apparaît court avec une taille d'environ 8 à 24 μm , une membrane ondulante peu développée. Il se colle aux globules rouges et se déplace lentement. *T. vivax* quant-à-lui, est plus repérable pour sa grande taille (18 à 31 μm), avec un flagelle libre et une membrane ondulante moins développée (Giordani et al., 2016). Il est aussi connu pour sa grande motilité et pour traverser rapidement le champ microscopique. En revanche, *T. brucei* a une membrane ondulante bien développée et forme souvent de petits cercles. Il se déplace librement mais plus lentement que *T. vivax* (Figure 2.2) (Uilenberg, 1998). L'examen de frottis sanguin frais est simple et peu coûteux mais manque de sensibilité (limite de détection d'environ 10^4 trypanosomes/ml de sang) (OIE, 2018b, Uilenberg, 1998). Les frottis sanguins fins et épais fixés dans du méthanol ou de l'acétone et colorés avec du MGG peuvent être utilisés respectivement pour détecter les trypanosomes sanguins et pour déterminer les espèces concernées (Uilenberg, 1998). Ils sont plus sensibles que l'examen du frottis frais et permettent une identification plus précise d'espèce (Kalu et al., 1986, Paris et al., 1982). Cependant, toutes ces techniques réunies restent peu sensibles en phase chronique, au moment où la parasitémie est généralement plus faible que celle observée en phase aiguë. Ainsi, des méthodes dites de concentration deviennent nécessaires pour augmenter le volume de sang à examiner et concentrer les trypanosomes.

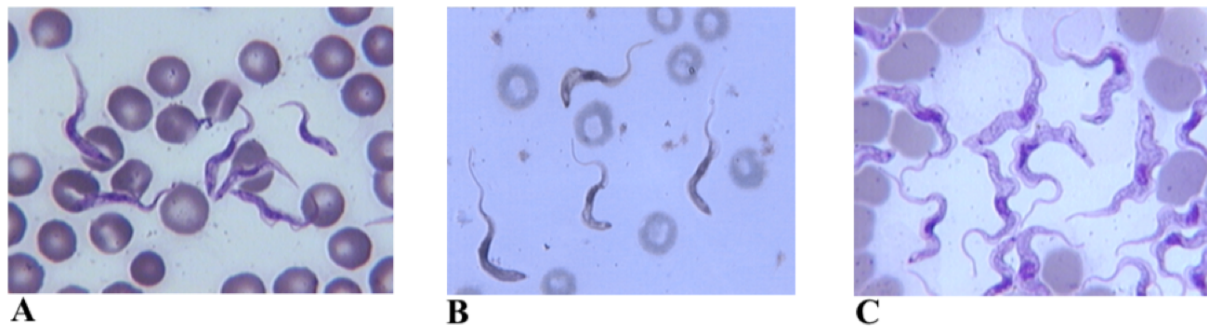


FIGURE 2.2 – Aspects morphologiques de trypanosomes responsables de la TAA dans un frottis sanguin. A. *T. congolense* (cliché I. Sidibé), B. *T. vivax* (cliché I. Sidibé), C. *T. brucei* (D. Cuisance).

2.2.2.2 Examens microscopiques après concentration parasitaire

Deux techniques de centrifugation sont très largement utilisées pour améliorer la sensibilité de l'examen microscopique : La technique de Woo (Woo, 1970) ou Haematocrit Centrifugation Technique (HCT) et sa dérivée plus évoluée, la technique définie par Murray basée sur l'approche de la couche leucocytaire, BCT (Buffy Coat Technique) (Murray and Dexter, 1988). La technique de Woo se fonde sur la séparation par sédimentation des différents composants du sang en fonction de leur taille, leur forme et leur densité dans des tubes capillaires microhématocrites. Après centrifugation, l'hématocrite permettant d'estimer l'anémie est déterminée et les trypanosomes sont observés directement dans le tube capillaire au niveau de la jonction leucocytaire au microscope optique. Pour la BCT, les tubes capillaires sont coupés au niveau de l'interface couche leucocytaire/plasma. La couche leucocytaire extrudée sur une lame, recouverte d'une lamelle, est ensuite examinée au microscope à un grossissement de 400x avec un éclairage de fond sombre ou à contraste de phase. Comme la technique de Woo, la BCT permet également d'apprécier l'hématocrite (PCV, Packed Cell Volume) et d'estimer la parasitémie par un système de notation (scoring). Elles sont plus sensibles que l'examen du sang frais avec une sensibilité analytique dépendant de l'espèce de trypanosome avec limite minimum de détection de 100 à 1000 parasites/mL (Desquesnes and Dia, 2003, Paris et al., 1982, Uilenberg, 1998).

D'autres part, une méthode de chromatographie est également employée pour enrichir un échantillon de sang en trypanosomes. Il s'agit de la chromatographie échangeuse d'anions sur résine de diéthylamino-éthyle (DEAE) exploitant la différence de

charges électriques entre les trypanosomes (à charges neutres) et les éléments figurés du sang dont les érythrocytes (chargés négativement) en fonction du pH. Les érythrocytes et les cellules blanches sont capturés dans la colonne tandis que les trypanosomes sont élués. Couplée aux techniques de centrifugation, elle apporte une grande sensibilité à la détection de trypanosomes (Camara et al., 2010, Lanham and Godfrey, 1970). Cependant, elle n'est pas couramment utilisée pour les animaux dans des conditions de terrain et peut être très « chrono-phage » et coûteuse. Toutefois, les méthodes microscopiques sont les plus simples et les moins onéreuses pour diagnostiquer la TAA (Uilenberg, 1998).

2.2.2.3 Techniques de culture des parasites

Dans certains cas, l'inoculation, à des rongeurs, de sang d'animaux au statut infectieux incertain peut être utilisée lorsque qu'on suspecte une infection mais que la parasitémie est indétectable, ou encore lorsqu'il est nécessaire d'amplifier le parasite pour affiner le diagnostic d'espèces ou de sous-espèces de trypanosomes. Cette technique est plus sensible que les méthodes de concentration, mais dépend des espèces de trypanosomes, toutes n'étant pas infectieuses pour les rongeurs (par exemple *T. vivax*). De plus, elle achoppe sur le coût, l'éthique et l'aspect pratique, et le diagnostic n'est pas immédiat (Büscher et al., 2005, Hailu, 2019, Uilenberg, 1998). La culture *in vitro* (kit KIVI) est également une méthode pour révéler une infection par les trypanosomes mais reste peu pratique (Verloo et al., 2000). Elle est très adaptée pour la mise en évidence de *T. theileri*, qui est une espèce non pathogène, présente en faible nombre dans le sang mais facilement cultivable. Cette méthode reste cependant coûteuse et délicate (Truc et al., 1992).

2.2.3 Diagnostic moléculaire

Les méthodes de diagnostic moléculaires sont basées sur la mise en évidence de séquences de nucléotides spécifiques d'un sous-genre, d'une espèce, d'un type ou d'une souche de trypanosome. Elles permettent de détecter une infection « active » par les trypanosomes dès cinq jours après l'infection aussi bien chez l'hôte vertébré que chez l'insecte vecteur.

2.2.3.1 Détection d'ADN par des sondes

L'utilisation de sondes marquées a été la première technique moléculaire employée pour mettre en évidence la présence de trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon* via la détection de leur matériel génétique. Dans cette technique, l'ADN est dénaturé en portant à ébullition l'échantillon à analyser. Les brins d'ADN séparés sont par la suite fixés sur une membrane. L'ADN du parasite est mise en évidence par hybridation d'un oligonucléotide marqué, d'une dizaine de paires de bases, complémentaire à une portion cible d'un brin de l'ADN des trypanosomes. Cet oligonucléotide constitue ce que l'on appelle une sonde qui peut être marquée de deux façons : soit par incorporation d'un composé radioactif (très souvent l'isotope ^{32}P), soit par un couplage chimique avec une enzyme (phosphatase alcaline). Pour des nombreuses raisons, notamment la complexité de la technique, l'instabilité (et la dangerosité) des matériaux radioactifs, la nécessité d'une infrastructure adaptée et d'une expertise adéquate, cette technique a peu à peu été remplacée par les méthodes d'amplification d'ADN notamment la PCR et a fini par être abandonnée (Uilenberg, 1998).

2.2.3.2 Amplification d'ADN par PCR

La PCR, pour Polymerase Chain Reaction ou Réaction de Polymérisation en Chaîne en français, permet d'amplifier des séquences cibles d'ADN dans un milieu tamponné *in vitro* jusqu'à les rendre détectables. Grâce à un couple d'amorces (une pour chaque brin, sens et anti-sens) complémentaire et flaquant la région cible, une séquence d'ADN peut être copiée en plusieurs millions d'exemplaires par une polymérase (Desquesnes and de La Rocque, 1995, Mullis et al., 1986). La réaction enzymatique s'effectue en quelques heures (environ 2 heures) et est contrôlée par des cycles thermiques répétitifs. Après plusieurs cycles d'amplification, le produit de la PCR appelé « amplicon » est révélé par migration sur un gel d'agarose couplé à une coloration par un intercalant d'ADN comme le SYBR Green, le bromure d'éthidium ou encore le Gel red (Uilenberg, 1998).

En termes de sensibilité, la PCR est 20 à 500 fois plus sensible (détection de 1-20 trypanosomes/mL) comparée aux techniques parasitologiques. Sa spécificité est fonction des amorces choisies et surtout de la séquence cible à détecter. Ce fragment

d'ADN peut être commun à tous les trypanosomes ou spécifique à une espèce ou encore à une sous-espèce (Desquesnes and Dávila, 2002). On distingue ainsi les PCR multispécifiques (Pan-Trypanosomes : détection de tous les trypanosomes) des PCR monospécifiques (détection d'une espèce ou d'une sous-espèce spécifique). Grâce à cette possibilité qu'offre la PCR, l'épidémiologie des trypanosomes a été mieux élucidée ces dernières années. Il est maintenant possible de discriminer des trypanosomes morphologiquement similaires mais différents par leur spectre d'hôtes et leur degré de pathogénicité notamment dans le sous-genre *Nannomonas*. Il en est de même pour les sous-groupes taxonomiques de *T. congolense* : savane, forêt, kilifi ou Tsavo (Uilenberg, 1998). En termes de choix de cibles, les ADN ribosomaux et satellites sont les plus privilégiés. Les gènes 18S et 5,8S de l'ARN ribosomal sont hautement conservés et flanquent la courte séquence d'ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) conservée et répétée 200 à 500 fois (Desquesnes and Dávila, 2002). La PCR ciblant le gène ITS1 est multispécifique et est dite « diagnostic pan-trypanosome ». Elle permet également de distinguer les espèces par polymorphisme de la taille de fragments amplifiés, en particulier pour *T. congolense* et *T. vivax*, des trypanosomes appartenant au sous-genre *Trypanozoon* (*T. evansi* et *T. equiperdum*, *T. brucei* spp). Les ADN satellites quant à eux sont des séquences répétées 10 à 20 000 fois dans le génome et leur détection est très sensible pour le diagnostic pan-trypanosome. Toutefois, La distinction des espèces au sein du sous-genre *Trypanozoon* est peu évidente. En sus de leur morphologie similaire, ces trypanosomes sont très proches au niveau génétique. Contrairement aux espèces *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* qui chez l'homme peuvent être discriminées respectivement avec les amorces Tbs-GP (Desquesnes and Dávila, 2002) et Tbrc (Radwanska et al., 2002). Il n'y a cependant pas d'amorces spécifiques pour *T. b. brucei* chez l'animal. Distinguer *T. evansi* de *T. equiperdum* par PCR est tout aussi problématique. Le couple d'amorces actuellement utilisé cible le gène RoTat1.2 de *T. evansi* qui n'est pas exprimé chez les espèces *T. brucei* s.l., *T. equiperdum* et chez *T. evansi* de type B. Cependant, ce gène existe en copie unique, cela limite la sensibilité de la PCR. Il existe en outre certaines souches de *T. equiperdum* pour lesquelles les PCR RoTat1.2 sont positives. Ainsi, l'ADN kinetoplastique a été proposé comme cible pour distinguer les *Trypanozoon* mais l'identification reste toujours problématique. *T. evansi* et certains *T. equiperdum* sont dépourvus de maxi-cercles ce qui permet de les distinguer de *T. brucei* mais certaines souches bien connues de *T.*

evansi disposent de mini-cercles très différents (type A et type B) et d'autres souches sont naturellement akinétoplastiques (absence de kDNA) (Borst et al., 1987).

La PCR est applicable à une grande échelle et est idéale pour les études épidémiologiques. Son avantage en matière de sensibilité et de spécificité est inégalable comparé au diagnostic microscopique. Toutefois, elle présente également de nombreux défauts. Elle n'est pas utilisable en diagnostic de routine en partie à cause de sa sensibilité aux éléments inhibiteurs sanguins et de la nécessité d'une étape de purification préalable de l'ADN qui est limitante et coûteuse (Reifenberg et al., 1997). Ainsi, des résultats faussement négatifs peuvent être fréquemment observés. D'autre part, elle nécessite également des bonnes installations et un personnel bien qualifié (Uilenberg, 1998).

D'autres techniques dérivées de la PCR permettent également de faire l'identification des espèces de trypanosomes. On peut citer les RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), la PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) et la qPCR (quantitative PCR ou PCR en temps réel). La dernière a été essentiellement développée pour le sous-genre *Trypanozoon*. La PCR-RFLP ciblant la sous-unité ribosomale 18S est idéale pour la détection de différentes sous-espèces en un test unique (Geysen et al., 2003). Enfin, la PCR-ELISA, une association de l'amplification de l'ADN et de sa révélation par une sonde couplée à une enzyme, a également été essayée pour l'identification de trypanosomes (présente une grande spécificité).

2.2.3.3 Amplification d'ARN

L'amplification d'ARN est une technique initialement développée pour la détection de l'ARN ribosomique 16S de *Trypanozoon*. Nommé NASBA (nucleic acid sequence-based amplification), cette technique a été adaptée à la détection de trypanosomes en 2007. Elle se fait à une température unique et basse (40°C). Cette faible température d'amplification est la principale faiblesse de la technique, car elle favorise des hybridations non spécifiques (Mugasa et al., 2008). En outre l'instabilité de l'ARN rend cette technique plus incertaine. Aucun kit n'a été développé sur cette technique (WHO, 2013). Néanmoins, elle a été le précurseur de la technique LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) qui a été par la suite développée par Notomi *et al.* en 2000

(Notomi et al., 2000). Cette technique sera abordée dans le paragraphe qui suit.

2.2.3.4 LAMP (amplification iso-thermale)

La LAMP est une technique qui permet d'amplifier une séquence cible d'acides nucléiques à une température unique (isothermale). Elle a été décrite comme étant un test rapide, spécifique, sensible et relativement simple à mettre en œuvre. Elle est caractérisée par l'utilisation d'au moins deux couples d'amorces (internes, externes et amorces de bouches) qui reconnaissent et lient six régions différentes de la séquence cible auxquelles ils sont complémentaires (Eiken, n.d., Notomi et al., 2000). La réaction se fait généralement entre 62 et 65°C grâce à une polymérase thermostable dotée d'une activité de déplacement de brin. Le plus souvent cette enzyme est une Bst DNA polymerase (polymérase I de *Bacillus stearothermophilus*) qui amplifie en moins d'une heure l'ADN de 10^9 à 10^{10} fois (Figure 2.3). Le produit d'amplification de LAMP est un mélange de structures secondaires de tailles différentes consistant en des répétitions alternativement inversées de la séquence cible sur le même brin.

Le produit d'amplification peut être visualisé par différentes méthodes. Il est possible de détecter l'amplicon par électrophorèse sur gel d'agarose et/ou de suivre la turbidité induite par la formation d'amplicons (Njiru et al., 2008). Cependant, l'électrophorèse peut être lente et la turbidité est peu sensible. La méthode la plus fréquemment utilisée est le suivi par réaction colorée d'un composé fluorescent ou d'un agent colorant directement à l'œil. C'est le cas de la calcéine qui forme un complexe avec le magnésium (magnesium pyrophosphate, $Mg_2P_2O_7$) produit par la réaction LAMP, donnant une coloration jaune-verte à la lumière visible. La berbérine qui est un alcaloïde végétal et le bleu d'hydroxynaphtol peuvent également être utilisés (Fischbach et al., 2015). Les intercalants d'ADN comme le SYBR Green et le GelRed, bien que potentiellement inhibiteurs de la réaction (notamment le SYBR Green), sont également très utilisés pour visualiser le produit après la réaction d'amplification (Silva et al., 2019). Pour toutes ces méthodes, les UV (Ultraviolet) peuvent être utilisés pour la visualisation. La révélation dans un système avec flux latéral (chromatographie) et bandelettes réactives a également été mise au point (Njiru, 2012). D'autres études ont permis de développer une approche quantitative par le couplage de la réaction de la LAMP à la fluorescence en temps réel (Xia et al., 2014). Même si cette méthode de LAMP en

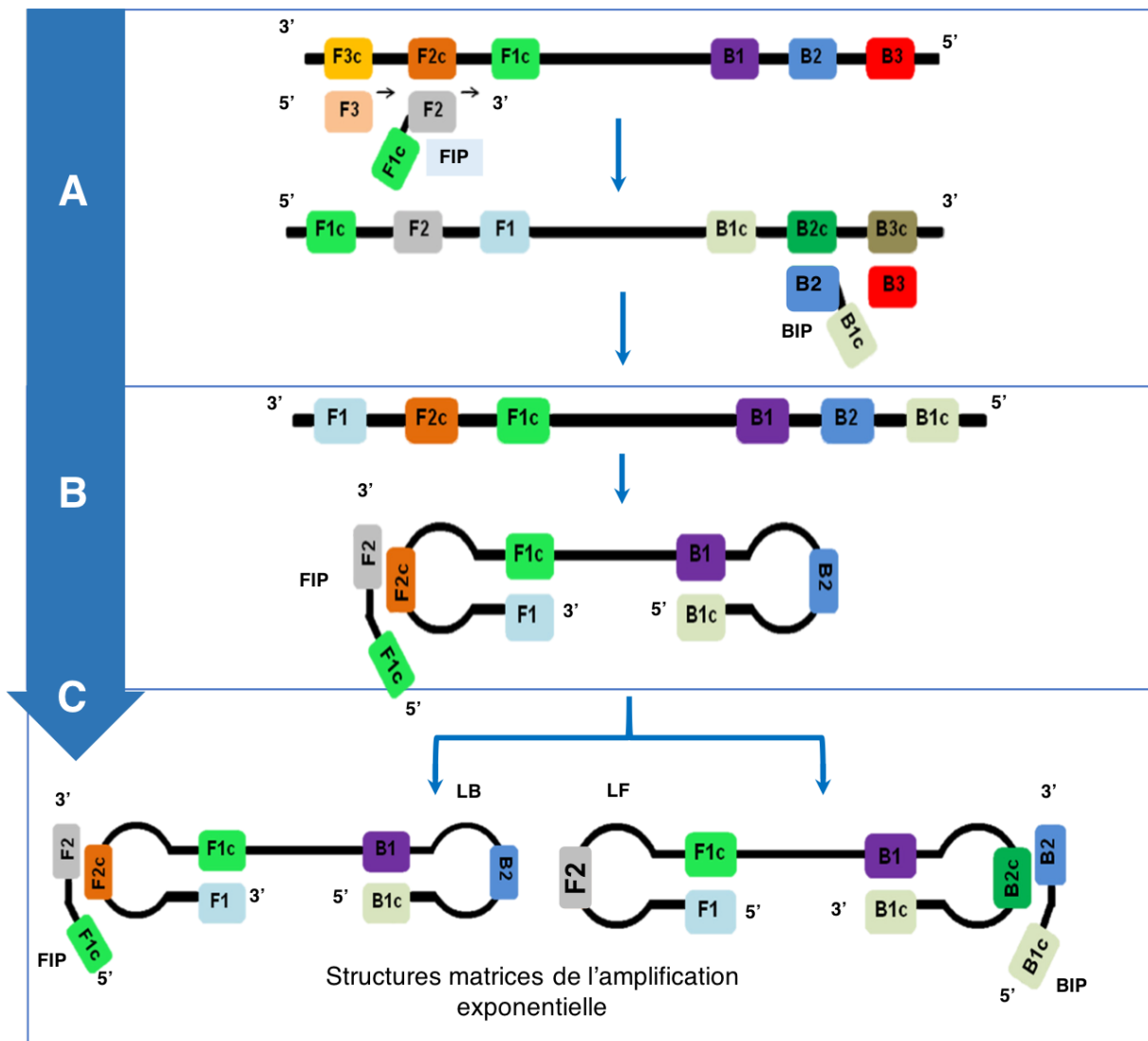


FIGURE 2.3 – Principe de la LAMP (Loop-Mediated isothermal Amplification). Les couples d'amorces en LAMP sont : le couple (FIP/BIP) interne, le couple (F3/B3) externe et souvent le couple de boucles (LF/LB). La réaction LAMP peut être divisée en 3 grandes étapes : **(A.)** Initiation par les amorces internes et l'ADN polymérase (Bst ou son homologue Bst 2.0 conçu *in silico*) dans les régions F2c et B2c. À une température de 65 °C, l'ADN double brin est en état d'équilibre dynamique. Une des amorces FIP ou BIP se fixe sur les régions complémentaires et la polymérase étend l'amorce et sépare le duplex d'ADN cible. Les amorces externes (F3 ou B3) s'hybrident ensuite à la région F3c ou B3c de la cible et amorcent la formation de la structure en haltère matrice de l'amplification exponentielle **(B.)**. Après plusieurs cycles d'amplification **(C.)**, des structures en tige/boucles et chou-fleur à boucles multiples constituant les produits LAMP sont formées. L'ajout d'amorces de boucles (LF et LB) peut accélérer le processus. La révélation se fait par électrophorèse, fluorescence (SYBR Green), turbidité ou par visualisation directe à l'œil nu. Figure adaptée de Silva *et al.*, (2020) (Eiken, n.d., Silva *et al.*, 2019).

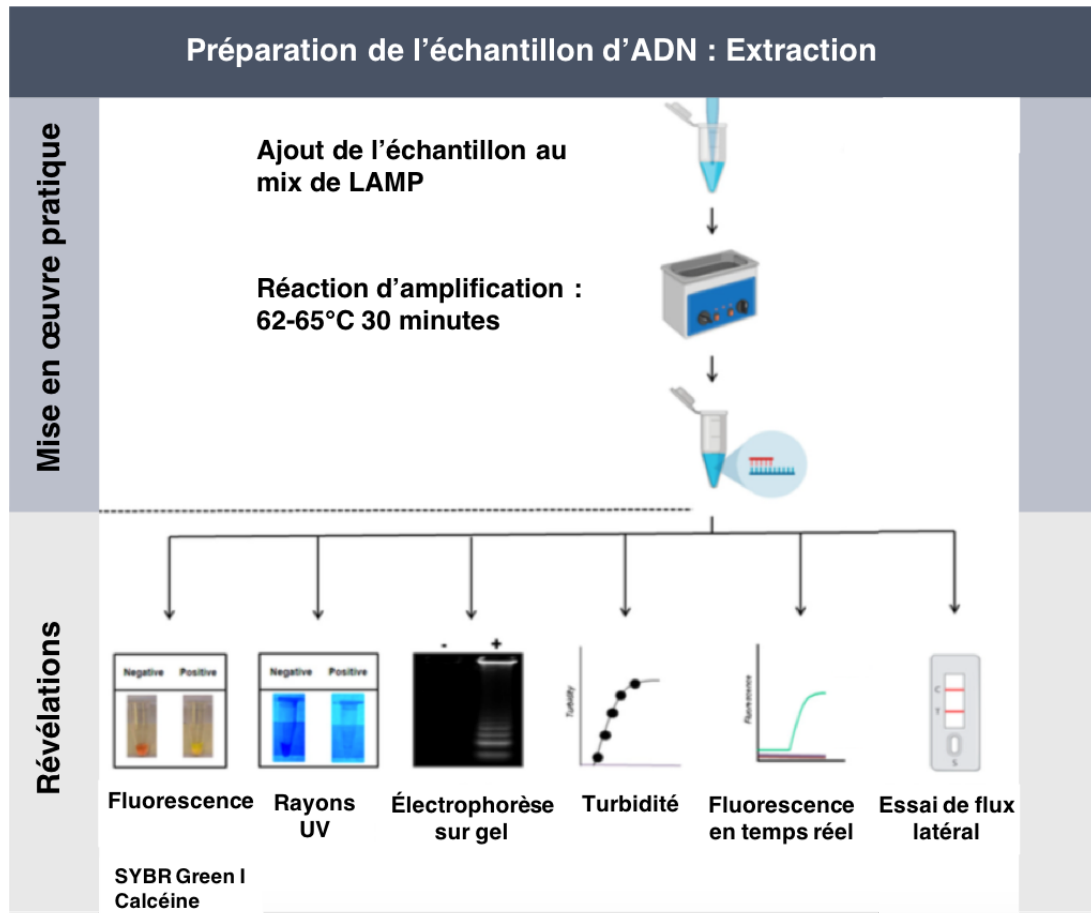


FIGURE 2.4 – Mise en œuvre de la LAMP et systèmes de révélation. Figure adaptée de Silva *et al.*, (2020) (Silva *et al.*, 2019).

temps réel ne sera probablement pas utilisable sur le terrain, elle reste un outil puissant pour le diagnostic en laboratoire (Figure 2.4).

Pour la détection de trypanosomes africains, la première application de la technique LAMP le fut en 2003 par Kuboki *et al.* Ces auteurs ont montré que la technique LAMP était 100 fois plus sensible que la PCR conventionnelle pour la détection des espèces du sous-genre *Trypanozoon in vitro*. Les tests ont été réalisés en ciblant le gène de la PFR A (Paraflagellar Rod) et le gène de la sous-unité P0 de la protéine ribosomique respectivement de *T. brucei* et de *T. congolense* (Kuboki *et al.*, 2003). Grâce à des couples d'amorces PFR A, les auteurs ont montré que la réaction de la LAMP permet de détecter spécifiquement les *Trypanozoon* et que les amorces P0 amplifiées exclusivement *T. congolense*. Par la suite un kit a été développé et commercialisé en 2012 par Njiru pour la HAT. Ciblant le gène RIME (repetitive insertion mobile element), ce kit permet de détecter toutes les espèces du sous-genre *Trypanozoon* (Njiru, 2012). Il est

actuellement en cours d'évaluation dans le programme d'élimination de la maladie du sommeil comme problème de santé publique, mise en place par l'OMS.

Comparée à la PCR conventionnelle, la LAMP peut présenter plusieurs avantages. Elle est moins coûteuse (nécessite peu d'instruments, la réaction peut être effectuée dans un bloc chauffant ou un bain d'eau chaude), rapide (résultats en 1 heure), plus sensible et spécifique. Toutefois, ces avantages doivent être regardés avec recul car la technique présente également plusieurs défauts. À cause de sa très forte sensibilité, des résultats faussement positifs sont fréquemment observés notamment à cause de la contamination très récurrente par effet aérosol. Par ailleurs, bien qu'elle soit en cours d'évaluation sur le terrain pour la THA, et excepté l'étude de Kuboki en 2003 peu d'essais ont été réalisés sur les autres espèces responsables de la TAA, en l'occurrence *T. congolense* et *T. vivax*.

En résumé, cibler l'ADN du parasite par les techniques de biologie moléculaire peut constituer un outil de diagnostic plus sensible, plus spécifique et signant une infection active (durée de vie de l'ADN parasitaire estimée à 48h) (Jarra and Snounou, 1998). En sus de ces avantages indéniables, les tests moléculaires sont adaptés aux enquêtes à grande échelle (Uilenberg, 1998). Néanmoins, en cas de parasitémie très faible (<1 trypanosome/mL) et des contaminants/inhibiteurs lors de l'étape de purification non propre du matériel génétique (ADN) matrice, l'amplification par les méthodes basées sur le principe de la PCR peuvent être inhibées et donner des résultats négatifs (OIE, 2018**b,c**). La LAMP reste un test en évaluation et sa forte sensibilité aux contaminations la rend peu fiable. Par ailleurs, il faut aussi noter que les espèces de trypanosomes du sous-genre *Trypanozoon* sont essentiellement des parasites tissulaires. À la différence de *T. congolense* et dans une moindre mesure de *T. vivax*, l'infection aux *Trypanozoon* donne souvent lieu à une parasitémie très faible qui atteint rarement le seuil de détection en parasitologie et parfois même des tests de diagnostic moléculaire (Büscher et al., 2019, Silva Pereira et al., 2019). Dans ce contexte, les tests de diagnostic sero-immunologiques sont employés pour fournir des preuves indirectes de l'infection par les trypanosomes.

2.2.4 Immuno-diagnostic

Le diagnostic immunologique ou immunodiagnostic est basé sur la mise en évidence de la liaison antigène-anticorps formant le complexe immun. Ainsi, ces méthodes vont consister soit à détecter directement les antigènes parasitaires, relargués dans la circulation sanguine, par l'intermédiaire d'anticorps spécifiques, soit à détecter la réponse immune de l'hôte contre l'infection, c'est-à-dire les anticorps produits tels que les immunoglobulines de type M (IgM), plus précoces, et les immunoglobulines de type G (IgG) plus tardives et persistantes. Les tests de détection des antigènes parasitaires, signant une infection active, ont très peu été concluants pour la TAA. La plupart de tests de diagnostic disponibles sont basés sur la détection d'anticorps.

2.2.4.1 Les tests sérologiques (détection d'anticorps)

La persistance des anticorps (notamment les IgG) dans la circulation peut aller jusqu'à plusieurs mois suivant la guérison spontanée ou après traitement. La détection des ces anticorps ne permet pas d'affirmer que l'infection est (encore) active mais permet de tracer le contact avec le parasite, qu'il soit encore présent lors de l'analyse sérologique ou bien qu'il ait été éliminé. Pour cette raison, les tests de diagnostic sérologiques sont surtout employés dans les études épidémiologiques (surveillance, contrôle, étude de prévalence et suivi de campagne de lutte). Pour les trypanosomoses animales africaines, il existe plusieurs techniques de diagnostic dont l'IFAT, le CFT, le CATT, l'ELISA et le test de trypanolyse immune. Ces techniques sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

2.2.4.1.1 Le test d'agglutination : CATT (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis)

Le test CATT est basé sur l'agglutination directe des parasites par des immunoglobulines de type M (IgM) de l'hôte mammifère. Initialement développé pour *T. brucei gambiense*, il a été adapté à la détection de *T. evansi* (Songa and Hamers, 1988). Ce test nommé CATT/*T. evansi*, permet de mettre en évidence une infection à *T. evansi*. Dans la pratique, des parasites de la souche *T. evansi* RoTat 1.2, purifiés, fixés et colorés et exprimant un antigène variable prédominant (VSG RoTat 1.2), sont utilisés comme source d'antigène parasitaire. La réaction d'agglutination se fait par la mise en contact

d'un échantillon de sérum ou de sang d'un animal infecté avec les antigènes parasitaires. Par la suite, les IgM (pentamériques) de l'animal se lient à plusieurs parasites formant un agglutinât visible à l'œil nu (OIE, 2018b,c) (Figure 2.5).

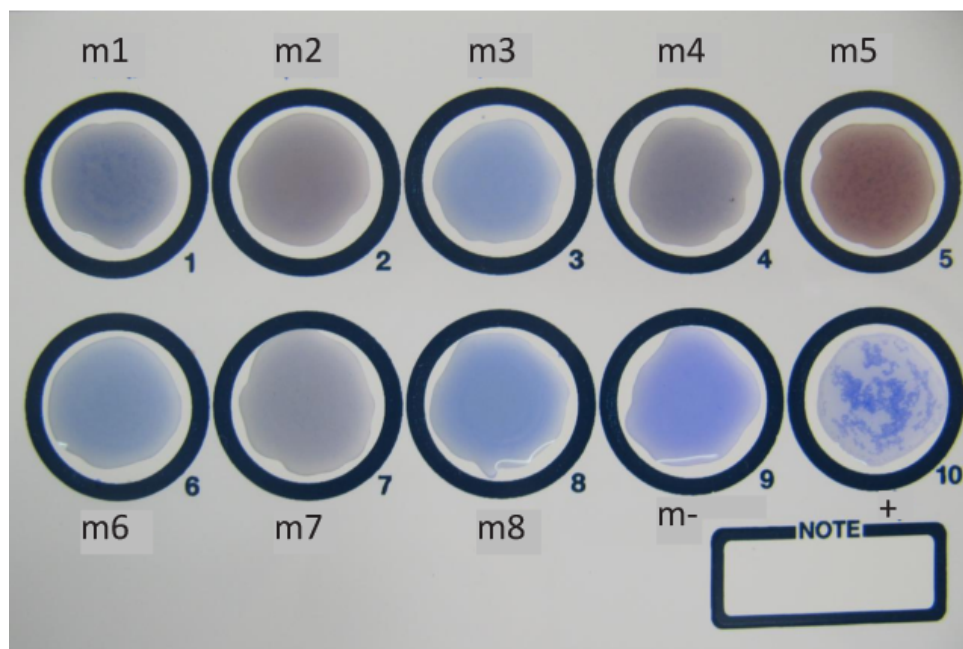


FIGURE 2.5 – Le test CATT/*T. evansi* (Card agglutination test for trypanosomosis). Zone de cercle 9 (échantillon témoin négatif), 10 (échantillon de contrôle positif). Échantillons positifs au test : 1 à 5. Image tirée de Sawitri *et al.*, (2019) (Sawitri *et al.*, 2019).

Très faciles d'usage sur le terrain, le test CATT est très employé dans les études épidémiologiques notamment pour confirmer le statut d'infection d'un individu. Il permet de faire un diagnostic actif (mise en évidence d'une infection active) grâce à la détection des IgM qui sont les premiers anticorps produits généralement en phase précoce, ou parfois dans une phase tardive avec une parasitémie persistante (OIE, 2018b). En plus, il est peu coûteux et nécessite peu d'expertise. Le test est commercialisé sous forme de kit, rapide d'emploi et présentant d'une bonne sensibilité. Cependant, le test CATT/*T. evansi* peut présenter une certaine réactivité croisée avec *T. vivax* et *T. equiperdum*. Sa spécificité et sa sensibilité doivent donc être améliorées. D'autre part, il nécessite une source d'énergie et un système réfrigéré pour sa mise en œuvre pratique sur le terrain (Uilenberg, 1998). D'autre part, il est produit sous une forme peu adaptée à un usage individuel.

2.2.4.1.2 Le test de trypanolyse immunitaire (TI)

Le test de trypanolyse est basé sur la lyse cellulaire médiée par le système du complément. De même que le test CATT, la trypanolyse a initialement été mise au point pour *T. brucei gambiense* avant d'être adapté à *T. evansi* et n'est pas utilisable pour *T. congolense* et *T. vivax*. Toutefois, il constitue un outil de diagnostic très spécifique méritant d'être testé pour la trypanosomose animale africaine (en particulier pour détecter *T. brucei brucei*), d'autant plus qu'il permet de faire des investigations sur le réservoir animal de la THA. C'est un test de référence (gold-standard) pour la THA (Jamonneau et al., 2010). Pour la détection de *T. evansi*, le test de trypanolyse a été développé en ciblant un seul épitope multicopie à la surface de la VSG RoTat1.2 exprimé par la souche A de *T. evansi* (Verloo et al., 2001). Le test est effectué en mélangeant des parasites vivants (exprimant cet épitope) en contact du sérum à analyser et des éléments du complément provenant du sérum de cobaye. Dans le cas d'une réaction positive (présence d'anticorps spécifiques), les parasites sont lysés et le résultat peut être observé au microscope entre lame et lamelle (Tehseen et al., 2015) (Figure 2.6).

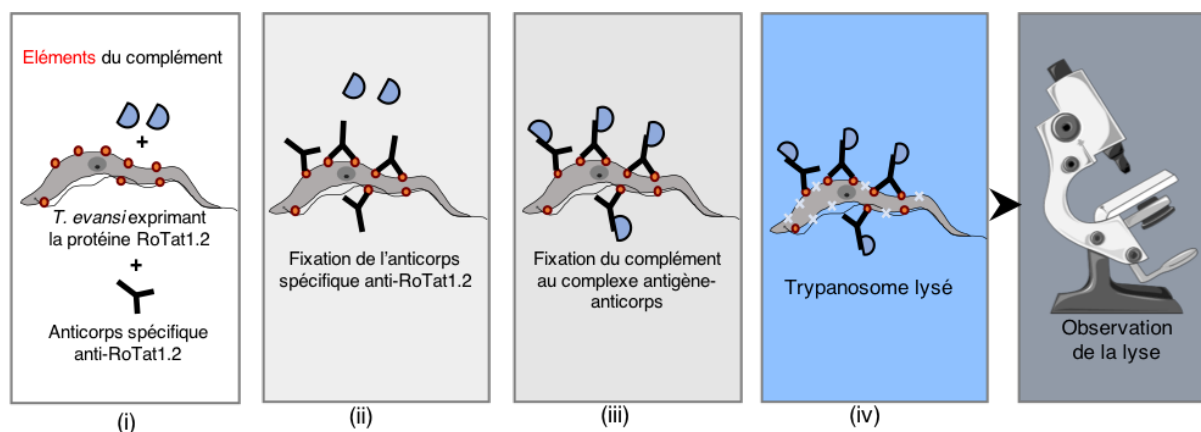


FIGURE 2.6 – Principe du test de trypanolyse. (i) Mise en contact de trypanosomes vivants avec du sérum, du plasma ou du sang d'un animal et du complément purifié de sérum de cobaye. (ii) L'anticorps anti-RoTat1.2 fixe la protéine RoTat1.2 sur la surface du trypanosome, (iii) Le complément se lie par la suite au complexe anticorps-antigène et (iv) induit la lyse du parasite. Le test est positif lorsque le pourcentage de lyse est supérieur à 50% au microscope.

Le test de trypanolyse, en dépit de sa très grande spécificité et de son adéquation à la confirmation du statut infectieux au niveau individuel, est réservé aux laboratoires de référence. Il nécessite obligatoirement la culture et l'entretien des clones de trypanosomes vivants, possible uniquement pour des laboratoires équipés et dotés d'une animalerie (Camara et al., 2010). De plus, sa mise en œuvre est complexe et peut sou-

vent donner lieu à des résultats faussement positifs même par un expert (Potts et al., 2013).

2.2.4.1.3 Le test de fixation du complément : le CFT (Complement Fixation Test)

Le test de fixation du complément est spécialement utilisé pour détecter une infection à *T. equiperdum*. Dans ce test, ce sont des trypanosomes totaux qui constituent l'antigène (Schoening, 1924). Cet antigène et le sérum de l'animal sont pré-incubés avec des éléments du complément purifiés de sérum de cobaye. Pour détecter le complexe immun, un système hémolytique (globules rouges de mouton, GRM, sensibilisés avec un anticorps anti-GRM) est ajouté. En présence d'anticorps spécifiques anti-*T. equiperdum* (réaction positive), le complément se liera au complexe immun et les GRM resteront intacts. En revanche, en l'absence d'anticorps spécifiques, le complément est activé et une lyse des GRM se produit (Figure 2.7) (Cauchard et al., 2014, Potts et al., 2013).

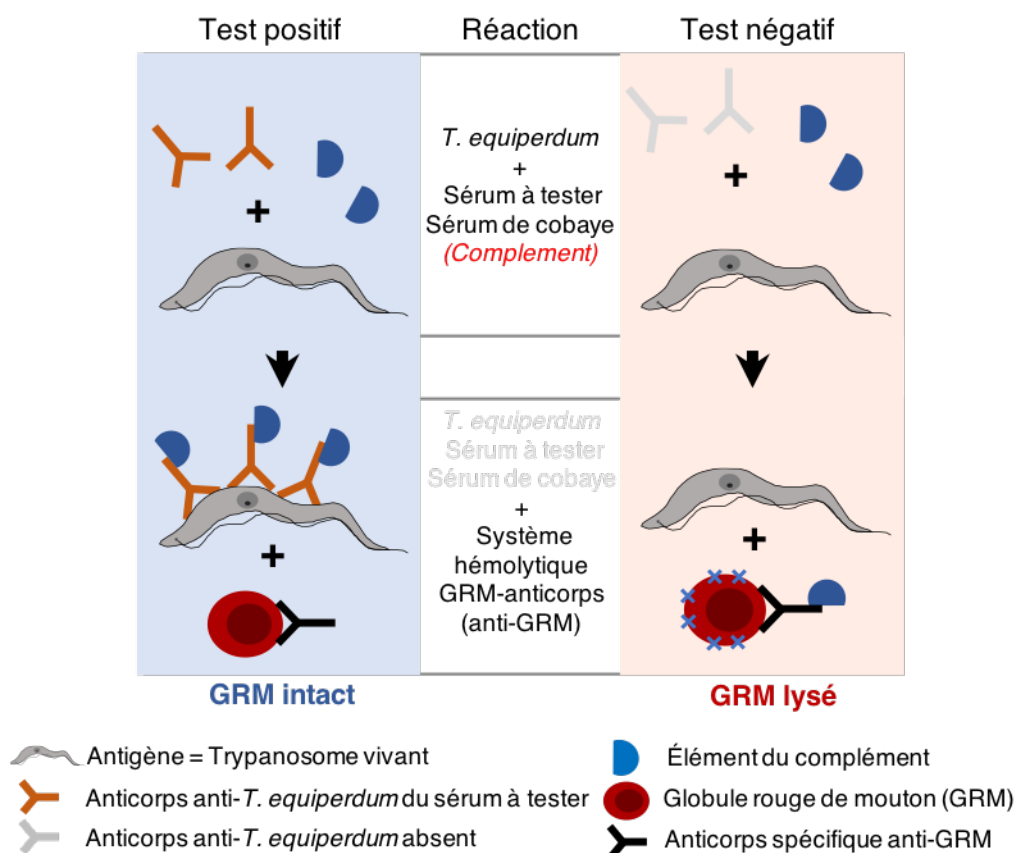


FIGURE 2.7 – Principe du test de fixation du complément (CFT).

Le test CFT est spécifique mais présente également les mêmes limites que la try-

panalyse. Les résultats faussement positifs notamment dû à la réactivité à *T. evansi* peuvent être problématiques dans la mesure où une infection à *T. equiperdum* est considérée comme incurable. Ce qui donne lieu à des conséquences graves (castration, isolement, abattage des animaux) (Büscher et al., 2019). Dernière difficulté, la production d'antigène pour ce test n'est pas harmonisée.

2.2.4.1.4 Le test d'immunofluorescence IFAT (Indirect Fluorescent Antibody Test)

L'IFAT forme avec l'ELISA, les deux tests recommandés par l'OIE pour détecter les infections à *T. brucei*, *T. vivax* et *T. congolense*. Le test d'immunofluorescence (IFAT) consiste à faire réagir des trypanosomes préalablement fixés sur une lame avec des anticorps provenant du sérum d'un animal infecté. Les anticorps fixant les protéines de trypanosomes sont détectés à l'aide d'un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore comme l'isothiocyanate de fluorescéine. Après fixation des lames au glycérol, la fluorescence est observée au microscope à fluorescence (OIE, 2018a) (Figure 2.8).

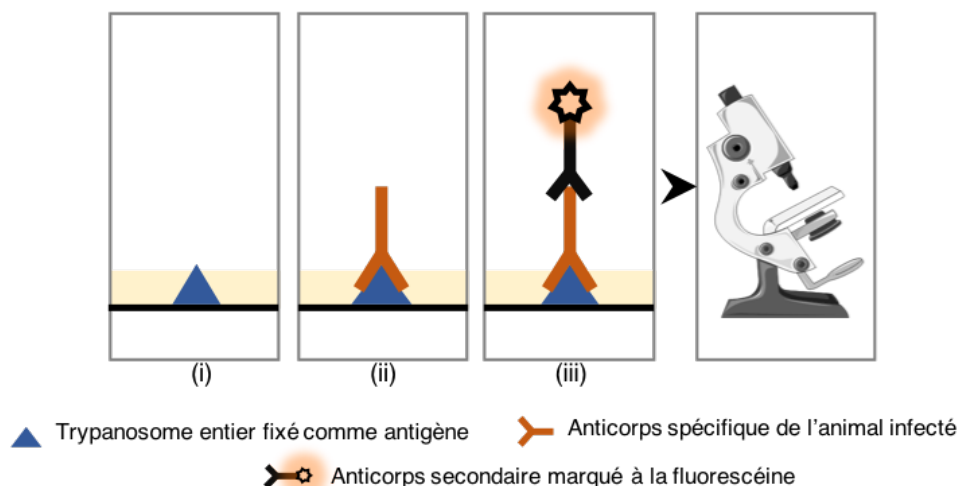


FIGURE 2.8 – Principe du test de détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte ou IFAT. (i) Des trypanosomes en suspension ou dans un prélèvement sanguin sont fixés entre lame et lamelle. (ii) Le sérum à tester est mis en contact avec les trypanosomes ; s'il contient des anticorps anti-trypanosomes, ils se lient aux trypanosomes. (iii) Un anticorps conjugué à la fluorescéine fixe spécifiquement l'anticorps anti-trypanosomes et la fluorescence émise à une certaine longueur d'onde (après excitation du fluorochrome) est observée au microscope dit d'épi-fluorescence (Desquesnes, 1997, Katende et al., 1987, Uilenberg, 1998).

Comme pour les précédents tests, l'IFAT peut également donner des résultats faussement positifs en raison de la réactivité croisée entre les espèces (Uilenberg, 1998). Ce test prend également du temps et nécessite un microscope à fluorescence, matériel coûteux à l'achat et non adapté à une utilisation sur le terrain. Cependant, il est

applicable à un grand nombre d'échantillons.

2.2.4.1.5 Le test ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Le test ELISA constitue le « gold standard » du diagnostic sérologique de la trypanosomose animale africaine (TAA). C'est un test immuno-enzymatique développé en 1971 par Engvall et Perlmann (Engvall and Perlmann, 1971). Le test repose sur la reconnaissance d'antigènes parasitaires, fixés sur une micro-plaque, par des anticorps provenant du sérum ou du plasma d'un animal infecté. Un anticorps secondaire couplé à une enzyme (le plus souvent la peroxydase) est ensuite ajouté et vient se fixer sur les complexes immuns lorsqu'ils sont présents. La présence d'anticorps spécifiques dirigés contre les antigènes parasitaires est mise indirectement en évidence par l'ajout d'un substrat chromogène qui, suite à l'action de l'enzyme présente sur l'anticorps secondaire, donne une coloration quantifiable par un spectrophotomètre (mesure de la densité optique). Il existe plusieurs variants de cette technique mais le plus employé pour la TAA (décrit ici) est l'ELISA indirect (Figure 2.9A, Figure 2.10). Les antigènes utilisés peuvent être la fraction soluble d'un lysat total de trypanosomes (Luckins, 1977) ou une protéine parasitaire spécifique (Boulangé et al., 2002, Fleming et al., 2014, 2016, Pillay et al., 2013). Les antigènes totaux solubles sont préparés à partir de trypanosomes (issus du sang de rongeurs infectés) qui sont purifiés par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-cellulose (Lanham and Godfrey, 1970) puis lysés et centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. Les antigènes spécifiques sont quant-à-eux des protéines de trypanosomes exprimées de manière récombinante en système bactérien, ou plus rarement, en système eucaryote (levures, baculovirus, parasites).

Les tests basés sur les antigènes totaux étaient encore il y a peu, les seuls tests ELISA existants pour la TAA et ces antigènes restent toujours les antigènes de référence recommandés par l'OIE. Bien qu'ils aient une sensibilité et une spécificité acceptables, ces tests ne permettent pas une détection « espèce spécifique ». Par ailleurs, la production de grandes quantités d'antigènes à partir du sacrifice d'un nombre important de rongeurs est éthiquement discutable. De plus, des difficultés de standardisation se posent fréquemment y compris pour l'IFAT (Ijagbone et al., 1989). De nombreuses études ont été menées pour pallier ce problème d'harmonisation d'antigènes, notamment par l'utilisation d'antigènes récombinants. Plusieurs protéines recombinantes ont

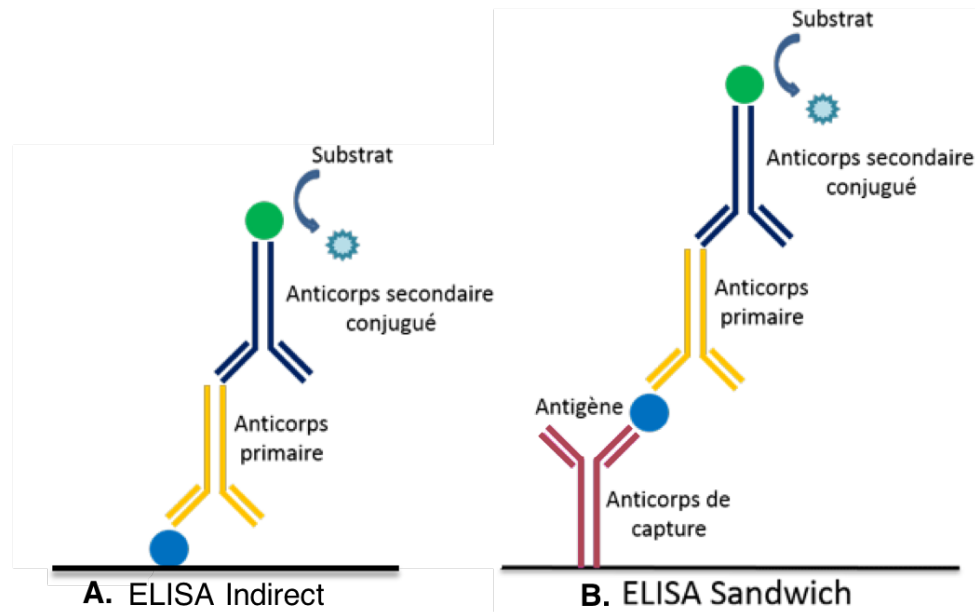


FIGURE 2.9 – Principe de l'ELISA indirect et de l'ELISA Sandwich. A. <https://cutt.ly/NbSQVwj>. B. <https://cutt.ly/jbSQL9g>.

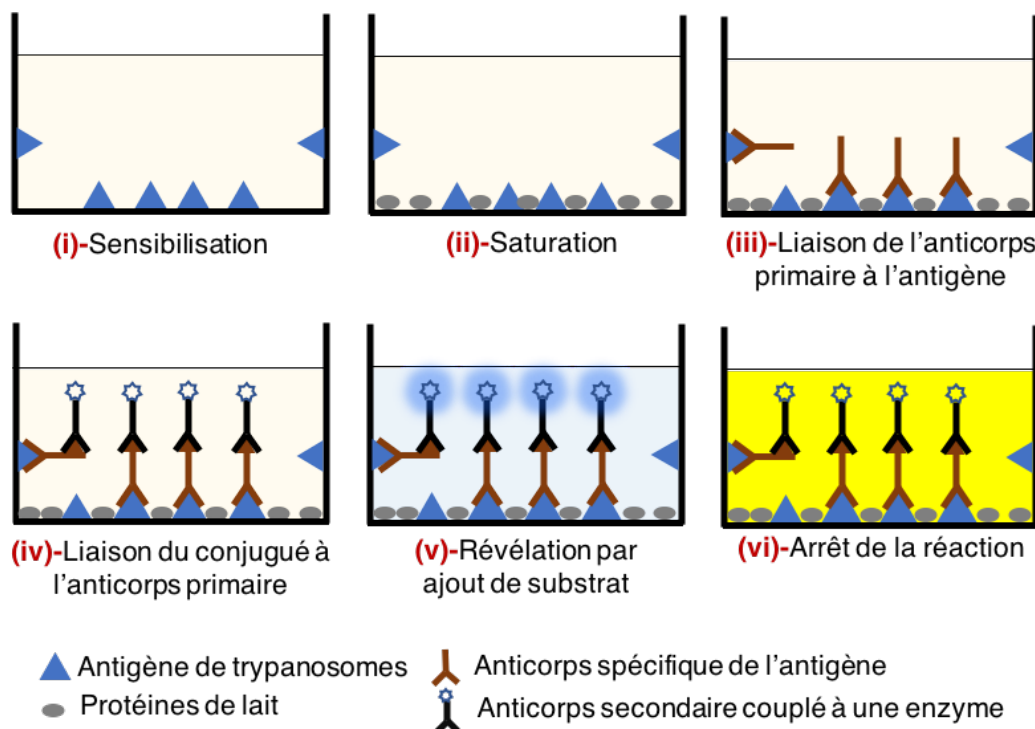


FIGURE 2.10 – Les étapes d'un test ELISA indirect de détection d'anticorps. (i)-Sensibilisation de la plaque ELISA avec une préparation d'antigène (lysat totaux ou antigène recombinant). (ii)-Saturation de puits sur la plaque avec des protéines non spécifiques (lait ou albumine de sérum bovin). (iii)-Liaison des anticorps spécifiques (à l'antigène), provenant du sérum de l'animal. (iv)-Liaison de l'anti-sérum conjugué à une enzyme (peroxydase le plus souvent). (v)-Révélation de la réaction antigène-anticorps par l'ajout d'un composé chromogène, substrat de l'enzyme : l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) ou le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) et mesure de la densité optique (DO). L'étape (vi) est optionnelle, elle permet de mieux apprécier la coloration de la réaction.

été testées comme antigènes dans les tests ELISA-Ac (anticorps) pour le diagnostic de la TAA. Des glycoprotéines invariantes de surface ont été utilisées pour développer un test ELISA-Ac pour *T. congolense* et pour *T. vivax* (Fleming et al., 2014, 2016). Plus récemment, un test ELISA-Ac de *T. vivax* et *T. congolense* utilisant respectivement les protéines TvGM6 et TcCB1 comme antigènes a également été développé puis adapté en test de diagnostic rapide (TDR) (Boulangé et al., 2017). Cependant, malgré ces limitations, le test ELISA reste un outil puissant et privilégié pour les études épidémiologiques.

2.2.4.2 Détection d'antigènes

Le test de détection d'antigène se fait par ELISA de capture dit ELISA sandwich. La détection d'antigènes circulants de trypanosomes, preuve directe d'une infection active, devrait permettre une amélioration significative de la spécificité du diagnostic de TAA (Nantulya and Lindqvist, 1989, Nantulya et al., 1987). Les premiers tests utilisaient des anticorps monoclonaux spécifiques de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* pour la détection d'antigènes invariants et circulants, par ELISA de capture. Ils montrent une faible sensibilité pour la détection de *T. vivax*, et une faible spécificité (forte proportion de faux positifs), associée à une réactivité croisée pour *T. congolense* et *T. b. brucei* (Bengaly et al., 1995, Desquesnes and de La Rocque, 1995, Uilenberg, 1998). Ces échecs, liés notamment à la faible quantité d'antigènes libres circulants, ont conduit à les abandonner temporairement (Desquesnes and de La Rocque, 1995). Par la suite, des épreuves sur bandelettes réactives (Kashiwazaki et al., 1994) et un test LAT (Latex Agglutination Test) permettant de détecter spécifiquement *T. evansi* (Nantulya, 1994) ont été développés.

Récemment un test de détection de la pyruvate kinase de *T. congolense* a été développé. Il s'agit d'un ELISA sandwich (Figure 2.9B) utilisant des « nanobodies » (Pinto Torres et al., 2018). Ces anticorps propres aux Camelidae ont un domaine unique dix fois plus petit que celui d'une immunoglobuline classique. Chez les bovins expérimentalement infectés par *T. congolense*, ce nouveau test montre une sensibilité de 79% et une spécificité de 91%. Deux années plutôt, un test similaire avait également été évalué pour *T. congolense* et ciblant cette fois, l'aldolase glycosomale. Ce test avait montré une performance diagnostique meilleure que le précédent. Il permettait

de détecter des infections expérimentales avec une valeur prédictive positive élevée (98%), une sensibilité de 87% et une spécificité atteignant jusqu'à 94% (Odongo et al., 2016). Toutefois, aucun test basé sur la détection d'antigène n'a encore été appliqué dans un contexte épidémiologique, tous les essais ont été réalisés dans des conditions expérimentales.

2.2.4.3 Les tests de diagnostic rapide disponibles

Un test de diagnostic rapide (TDR) est le test par excellence remplissant les critères ASSURED et utilisable sur le terrain. C'est le résultat de l'association de la chromatographie et de la réaction d'un anticorps (Ac) à un antigène (Ag). En d'autres termes, un TDR est l'adaptation d'un test ELISA robuste à un format d'immunochromatographie. Le principe du test est simple. Une goutte d'échantillon à analyser (sang ou sérum) est déposée sur le support de chromatographie (bandelette de nitrocellulose) suivi du dépôt d'un tampon de migration permettant de faire migrer l'échantillon et le conjugué (couplé à la streptavidine ou biotine et une nanoparticule d'or), le long de la bandelette. En présence d'Ac ou d'Ag spécifique, ce dernier se fixe à l'Ag ou à l'Ac correspondant ce qui entraîne une coloration faisant apparaître une bande. Sur la même bandelette, la réaction du contrôle positif a également lieu pour garantir le bon déroulement du test (Figure 2.11).

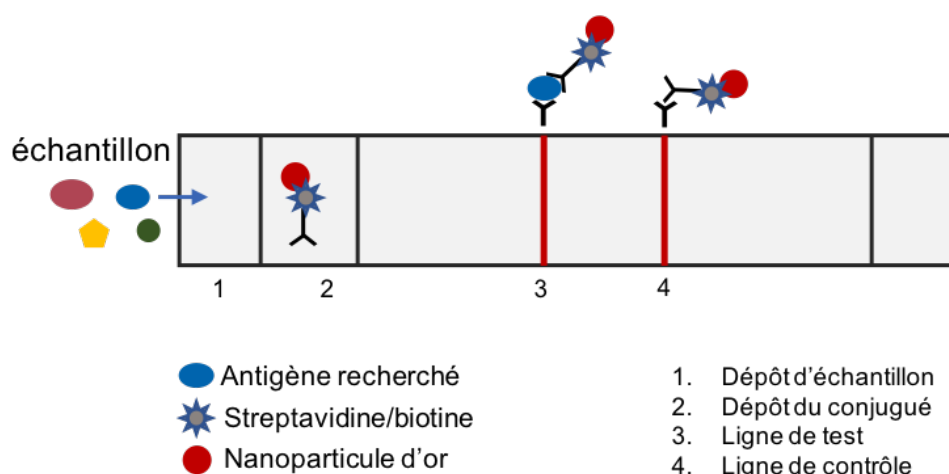


FIGURE 2.11 – Principe d'un test de diagnostic rapide de détection d'antigène.

Pour la TAA, les TDR sont surtout basés sur la détection d'Ac. Les antigènes totaux étant inadaptés au développement de TDR en partie à cause de leur manque

de spécificité et les difficultés de standardisation, ces sont essentiellement des protéines récombinantes qui ont été utilisés comme antigène. Malgré les nombreuses protéines testées, très peu de TDR ont été développés pour la TAA. Actuellement, seulement deux TDR ont été rapportés. Le premier est basé sur une glycoprotéine de la famille des ISG (Invariant Surface Glycoprotein). Ce test montrait une sensibilité et une spécificité de 92,0% (95% CI, 83,4% to 97.0%) et 89,8% (95% CI, 77,8% to 96,6%) (Fleming et al., 2016). Malgré sa spécificité basse par rapport aux antigènes totaux, l'Université de Dundee est à la recherche des partenaires pour sa commercialisation (<https://www.dundee.ac.uk/news>). Le test ELISA basé sur la protéine GM6, qui est une protéine du cytosquelette de *T. vivax*, et la CB1 (une cathesine B1) a été adapté récemment en format TDR permettant de détecter en même temps une infection à *T. vivax* et à *T. congolense* (Boulangé et al., 2017). Ce second test constitue l'un des rares TDR à avoir été commercialisé. Il a été introduit sur le marché par CEVA sous le nom de « VerY Diag test ». Le prototype, qui comprend les deux antigènes, présente une spécificité de 95,9% (95% C.I., 90,4%-100%) et une sensibilité de 92,0% (95% C.I., 85,9%-98,1%) pour *T. congolense* et 98,2% (95% C.I., 94,7%-100%) pour *T. vivax* (Boulangé et al., 2017). Ce TDR, malgré son manque de sensibilité dans les infections très précoces ou au contraire à un stade très tardif, renforce la spécificité et élimine partiellement le problème de standardisation.

En résumé, il existe une panoplie de méthodes de diagnostic pour les trypanosomes animales. Les tests d'agglutination, de trypanolyse ou de fixation du complément ciblent essentiellement *T. evansi* et donc ne sont pas adaptés à la *nagana* qui représente la trypanosomose la plus prévalente en Afrique sub-saharienne. On peut également constater que le choix d'un test particulier est guidé par différents facteurs dont l'objectif (diagnostic individuel ou à l'échelle du troupeau), le facteur économique, et l'expertise (OIE, 2018**b,c**). Les tests recommandés (IFAT et ELISA) pour la TAA se heurtent à des difficultés de standardisation des antigènes et peuvent également manquer de spécificité (qui est limitée au genre). Cependant, il existe très peu de TDR et les quelques rares tests développés sont inaccessibles pour les populations concernées. Le besoin en nouveaux tests TDR est donc incontestable.

Une revue de synthèse a été rédigée et publiée sur les différentes techniques de

diagnostic décrites précédemment dans le bulletin de l'Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur, au cours de cette thèse (article en annexe [page 221](#)).

2.2.5 Article

Magamba Tounkara, Alain Boulangé, Frédéric Bringaud, Magali Thonnus, Adrien Marie Gaston Belem, Zakaria Bengaly, Sophie Thevenon, David Berthier and Loïc Rivière. Les méthodes de diagnostic des trypanosomiasés animales africaines : avantages, limites et nouvelles pistes d'amélioration. *Bulletin de l'Association des Anciens Élèves de l'Institut Pasteur, Association des anciens élèves de l'Institut Pasteur*, 2021, 63 (242), pp.31-38. (hal-03225173).

3 | Les antigènes de trypanosomes africains : marqueurs de diagnostic

La connaissance des marqueurs antigéniques de trypanosomes, immunogènes ou non, a trois importances majeures. Elle permet d'identifier des cibles thérapeutiques, de chercher des antigènes immunogéniques pour élaborer un vaccin, et enfin de développer des tests de diagnostic sero-immunologique. L'identification de ces marqueurs passe par une meilleure exploration et compréhension de l'interaction hôte/parasite définissant à la fois les mécanismes de l'infection et de la progression des trypanosomes.

La VSG a longtemps été considérée comme étant la seule protéine à la surface de trypanosomes *in extenso*. Et même si elle demeure la plus abondante, d'autres protéines situées à la surface (ou non), peuvent également intervenir dans l'interaction des trypanosomes avec leur hôte notamment par leur reconnaissance par le système immunitaire de ce dernier. Si l'on ne se base que sur l'hypothèse selon laquelle toute protéine exposée, sécrétée ou libérée par les trypanosomes au cours d'une infection est potentiellement antigénique, il existe toute une panoplie d'antigènes éventuels qu'on pourrait décrire. Exemples : les récepteurs de surface permettant aux trypanosomes d'importer des nutriments, les glycoprotéines invariantes de surface et enfin les protéines cytoplasmiques libérées au cours d'une lyse parasitaire induite par le système immunitaire de l'hôte au cours d'une vague parasitémique. Ce chapitre fournit un aperçu sur des antigènes identifiés et évalués en diagnostic pour la TAA et les approches technologiques qui ont permis leur identification.

3.1 Les antigènes invariants de trypanosomes

Les antigènes invariants de trypanosomes sont de différentes natures. Ils peuvent être des protéines de surface, des protéines de la poche flagellaire ou encore des pro-

téines internes. Les protéines ciblées généralement en diagnostic sero-immunologique sont à la fois des protéines immunogéniques, notamment pour les tests de détection d'anticorps, et des protéines non immunogéniques mais suffisamment abondantes pour être détectées dans les tests de détection d'antigènes. *De facto*, plusieurs protéines ont été identifiées et caractérisées.

Un grand nombre de glycoprotéines invariantes de surface (ISG, Invariant Surface Glycoprotein) ont été identifiées dont certaines avec des fonctions inconnues. En 1992, Ziegelbauer et Overath ont décrit chez les formes sanguines de *T. brucei* trois glycoprotéines de taille différentes (60, 65 et 75 kDa) (Ziegelbauer and Overath, 1992). Ces protéines nommées par la suite ISG60, ISG65, ISG75 respectivement, présentaient des motifs de protéines transmembranaires. Par la suite, deux autres ISG (ISG64 et ISG70) ont été caractérisées (Jackson et al., 1993). Testées avec le sérum de lapins chroniquement infectés, l'ISG64 et l'ISG70 étaient spécifiquement reconnues. Grâce à la technique d'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse, Sullivan et al. (2013) ont identifié chez *T. brucei gambiense* trois des ISG déjà décrites (ISG64, ISG65 et ISG75) (Sullivan et al., 2013). Ces protéines exprimées et purifiées dans un système bactérien (*Escherichia coli*), ont été évaluées pour leur potentiel immuno-diagnostique par ELISA avec des sérums individuels et poolés. L'ISG64 et l'ISG65 ont donné une meilleure performance pour la détection de *T. b gambiense* (93-97% de Sensibilité, Se ; 93-94% de Spécificité, Sp) mais assez modérée pour *T. b rhodesiense*. Le test basé sur l'ISG65, qui était la plus réactive des protéines, a été celui adapté en format d'immunochromatographie sous forme de TDR qui présentait jusqu'à 100% de sensibilité (Se) et 92,5% de spécificité (Sp) (Sullivan et al., 2013). Pour les trypanosomes des animaux, plusieurs glycoprotéines invariantes ont également été identifiées et évaluées pour leur antigénicité. En général, ces sont des orthologues des protéines décrites chez *T. brucei*. Chez *T. congolense*, une ISG nommé Tc38630 a été testé en ELISA-Ac avec des sérums de bovins infectés expérimentalement. Ce testé a montré 87,2% de Se et 97,4% de Sp (Fleming et al., 2014). Et encore plus récemment, les mêmes auteurs ont réalisé une étude similaire sur l'orthologue de l'ISG65 chez *T. vivax*. Ils ont montré que cette protéine présentait 94,5% de Se et 88,0% de Sp en ELISA et dans un TDR 92% de Se et 89,8% de Sp (Fleming et al., 2016). Des études semblables ont été réalisées chez d'autres espèces notamment chez *T. evansi* et montrent toutes

une immunogénicité des ISG (Tableau 3.1). *A posteriori*, les glycoprotéines invariantes de surface présentent malgré leur faible nombre par rapport aux molécules de la VSG (estimé à 1 ISG pour 100 VSG), un fort potentiel antigenique à la fois pour le diagnostic mais aussi pour la vaccination. *En sus de* protéines décrites, il faut noter que d'autres ISG essentiellement des récepteurs et transporteurs sont présentes à la surface de trypanosomes. C'est le cas du transporteur de glucose identifié en 1992 par Bringaud et Baltz chez les formes sanguines de *T. brucei* (Bringaud and Baltz, 1992).

Par ailleurs, d'autres protéines membranaires localisées au niveau de la poche flagellaire du parasite, une phosphatase acide (Schell et al., 1990) et une phospholipase C (Grab et al., 1987), ou encore sur la membrane plasmique entourant le flagelle, une adénylate cyclase (produit d'expression des gènes ESAGs), ont été décrites. La protéine TFBP (transferin binding protein) est également une protéine de surface codée par les ESAGs (Schell et al., 1991) et localisée dans la poche flagellaire. Elle présente une région d'une dizaine d'acides aminés au milieu de sa séquence formant une boucle. Selon certains auteurs, cette boucle constitue une cible privilégiée du système immunitaire. Elle serait également la séquence que les trypanosomes font varier pour éviter une réponse anticorps par analogie avec le « switch » des gènes VSG (Borst et al., 1987). Pour finir, citons également un antigène constitué d'une préparation de flagelle purifié, qui a donné un excellent potentiel diagnostique (95,8% de Se et 94,4% Sp) (Ligi et al., 2016) montrant à la fois l'immunogénicité des protéines membranaires du flagelle et de leur interaction avec le système immunitaire de l'hôte.

TABLE 3.1 – Les antigènes majeurs testés en diagnostic sero-immunologique des trypanosomoses animales.

Antigène	Description	Espèce	ELISA (Se/Sp) ¹	LFT (Se/Sp) ²	Reference
MARP1	Protéine répétitive 1 associée aux microtubules	<i>T. brucei</i>	Immunoréactive ^e	--	Müller et al., 1991
GM6	Protéine du cytosquelette	<i>T. brucei</i>	Immunoréactive ^e	--	Müller et al., 1991
GM6 ^a	Protéine du cytosquelette	<i>T. vivax</i>	91,4% / 85,4 ± 6,9%	98,2% / 95,9%	Pilla et al., 2013 ; Boulangé et al., 2017
CB1 ^a	Cathepsine B1 (cystéine protéase)	<i>T. congolense</i>	Potentiel diagnostic ³	92,0% / 95,9%	Mendoza-Palomares et al., 2008 ; Boulangé et al., 2017
rrISG75	Glycoprotéines invariantes de surface	<i>T. evansi</i>	94,6% / 100%	--	Tran et al., 2009 ; Rogé et al., 2013
RoTat1.2 ^a	glycoprotéine variante de surface de <i>T. evansi</i> Rode Trypanozoon de type 1.2	<i>T. evansi</i>	98,9% / 98,9%	98,1% / 94,8%	Ngaira et al., 2005 ; Tran et al., 2009 ; Birhanu et al., 2015
FLA ^b	Flagelle purifié	<i>T. evansi</i>	95,8% / 94,4%	--	Ligi et al., 2016
PK^c	Pyruvate kinase	<i>T. congolense</i>	Potentiel diagnostic ³	79,2% / 91,9%	Pinto Torres et al., 2018
PKA R-like protein	Protéine kinase cAMP-dépendante R-like	<i>T. equiperdum</i>	Potentiel diagnostic ³	--	Mendoza et al., 2018
TvICATL	Peptidase cathepsine L-like	<i>T. vivax</i>	71,9% / 86,0%	--	Eyssen et al., 2018
HSP70/BIP ^b	Protéine de choc thermique 70 / Immunoglobuline de liaison	<i>T. congolense</i>	95,0-100% / 96,0%	--	Boulangé et al., 2002 ; Bossard et al., 2010
HSP70	Domaine c-terminale de 1aa (18,4 kDa)	<i>T. evansi</i>	48,7% / 91,3%	--	kumar et al., 2016
rISG65-1 ^a	Glycoprotéine invariante de surface	<i>T. vivax</i>	94,5% / 88,0%	92,0% / 89,8%	Fleming et al., 2016
rISG65-2	Glycoprotéine invariante de surface	<i>T. vivax</i>	94,5% / 88,0%	--	Fleming et al., 2016
Tc38630	Glycoprotéine invariante de surface	<i>T. congolense</i>	87,2% / 97,4%	--	Fleming et al., 2014
TcP46	--	<i>T. congolense</i>	Potentiel diagnostic ³	--	Zhou et al., 2014

¹ Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) de l'évaluation du potentiel diagnostic en ELISA indirect, ^b ELISA d'inhibition ; ^c ELISA Sandwich, ^e western blot

² Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) de l'évaluation du potentiel diagnostic en immunochromatographie (^a adaptation en TDR)

³ Pas de calcul de Sensibilité (Se) et Spécificité (Sp) : appréciation du potentiel diagnostic par la capacité discriminatoire de sérums négatifs et de positifs en ELISA)

Les autres protéines antigéniques de trypanosomes sont les protéines internes. Plusieurs de ces protéines se sont révélées être immunogéniques et de bonnes cibles de diagnostic. Dans les années quatre-vingt-dix, les protéines immunodominantes identifiées de trypanosomes présentaient toutes deux caractéristiques particulières. Elles possédaient dans leurs séquences des motifs répétés et étaient essentiellement des protéines de structure, associées au cytosquelette (Duncan et al., 1991, Lee et al., 1994, Müller et al., 1992). Testées avec les sérums d'animaux infectés, ces antigènes étaient reconnus spécifiquement (Tableau 3.1). L'identification particulière de ces protéines était favorisée par la technique utilisée (l'immunocriblage). Cette technique est plus sensible à la détection des antigènes à motifs séquentiels et répétitifs par l'intermédiaire des anticorps qui leur sont spécifiques. Ces antigènes, qui étaient *in fine* des protéines immunodominantes, ont servi de référence pour la sélection d'un certain nombre d'antigènes d'immunodiagnostic. C'est notamment le cas pour la protéine GM6 (Müller et al., 1992) dont la découverte a conduit à l'évaluation du potentiel diagnostique de ses orthologues chez *T. congolense*, *T. vivax* (Pillay et al., 2013) et chez *T. evansi* (Thuy et al., 2012). Son orthologue chez *T. vivax*, a fini par être inclus dans un test d'immunochromatographie (TDR VerY Diag) (Boulangé et al., 2017).

D'autres protéines internes, cytoplasmiques ou organellaires peuvent également se révéler très intéressantes comme marqueurs pour le diagnostic. En effet, plusieurs protéines glycolytiques, intrinsèquement abondantes, ont été ciblées dans les tests de détection d'antigènes pour le diagnostic des trypanosomoses animales. Citons par exemples : l'aldolase (Odongo et al., 2016) et la pyruvate kinase (Pinto Torres et al., 2018) utilisées pour la détection de *T. congolense*. En somme, les antigènes internes, qu'ils soient immunogènes ou pas, peuvent être ciblés pour développer à la fois les tests de détection antigènes et des tests basés sur la détection d'anticorps. Toutefois, les antigènes décrits ne représentent pas l'entièreté des antigènes internes connus de trypanosomes. Les facteurs pathogènes (de nature protéique) de trypanosomes sont également libérés lors d'une trypanolyse et font partir de ces antigènes internes.

3.2 Les facteurs pathogènes de trypanosomes

L'hypothèse du rôle potentiel de certaines molécules dans la pathogénèse de la trypanosomose a été émise par Tizard *et al.*, en 1973 (Tizard *et al.*, 1978). Il a été observé que les symptômes de la maladie chez les animaux infectés étaient plus sévères lors de la chute de la parasitémie induite par la typanolyse. Cette observation fut une preuve directe du lien entre les composés libérés par les parasites lysés et la pathogénèse de la maladie. Les composés ou facteurs mis en cause, étaient à la fois des produits dérivés du catabolisme (pyruvate et tryptophol) et des protéines, plus particulièrement des protéases et des phospholipases ou encore les formes solubles de la VSG. Cette dernière peut se fixer seule ou par l'intermédiaire de complexes immuns à la surface des hématies. Par l'activation du complément et de la phagocytose, la VSG serait responsable de l'élimination des hématies (Tizard *et al.*, 1978). Les protéases seraient impliquées dans la dégradation des protéines des liquides physiologiques et à la surface de cellules et aussi responsables des lésions du tissu endothélial. Les phospholipases, quant-à-elles, étaient décrites comme étant hémolytiques et cytotoxiques par le catabolisme de lipides membranaires des cellules de l'hôte générant des acides gras libres, qui sont également des puissants facteurs pathogéniques. Les conséquences pathogéniques de ces antigènes trypanosomiens ont conduit à la proposition du concept d'un vaccin anti-maladie qui aurait pour but d'éliminer les facteurs pathogènes et de modérer la progression de la maladie. En outre, Authié *et al.*, (1993a) ont montré, dans un modèle d'infection expérimentale de deux races bovines par *T. congolense*, que les N'Dama, qui sont trypanotolérants, ont des taux d'anticorps plus élevés que les Borans, qui sont trypanosensibles. Tous les bovins ont développé des anticorps contre plusieurs antigènes invariants immunodominants. Deux de ces antigènes, contre lesquels les réponses sérologiques discriminent les N'Dama des Borans, ont été identifiés : une HSP70/BiP de 69 kDa et une cystéine peptidase de 33 kDa (Authié *et al.*, 1993).

Plusieurs tentatives vaccinales ont été réalisées à partir des antigènes pathogéniques y compris la VSG, les sialidases (La Greca and Magez, 2011) et la cystéine peptidase (ou congopaïne) (Authié *et al.*, 2001) (voir la sous-section 2.1.1). Pour le diagnostic, quelques uns de ces antigènes notamment les cystéines peptidases ou

cathepsines ont été évalués et ont montré des excellents potentiels en serodiagnostic (Tableau 3.1). Ainsi, les antigènes induisant des effets pathogènes constituent donc des très bons marqueurs pour le diagnostic des trypanosomoses. Cependant, à la différence des antigènes invariants de surfaces, seulement un petit nombre de ces antigènes à effets pathogènes a été évalué en diagnostic. D'autre part, il y a peu d'études récentes visant à identifier des nouveaux facteurs. Avec les nouvelles facilités technologiques, la recherche et l'identification de ces facteurs ne devraient plus constituer une contrainte. Dans les années quatre-vingt, c'est la technique d'immunocriblage de banques d'expression qui avait révolutionné l'identification et la caractérisation des antigènes immunodominants (Young and Davis, 1983). De nos jours, il existe des méthodes plus inclusives qui permettent avec une grande sensibilité d'identifier un grand nombre de protéines de trypanosomes.

3.3 Les différentes approches d'identification des antigènes de trypanosomes

3.3.1 Immunocriblage de banques d'expression

La technique d'immunocriblage initiale est basée sur la détection par des anticorps spécifiques de protéines recombinantes partielles exprimées dans un système bactérien. Développée par Young *et al.*, (1983), cette technique ingénieuse utilise un vecteur d'expression bacteriophagique (bactériophage *lambda* λ gt11) qui permet l'insertion d'un fragment d'ADN étranger dans le gène de la β -galactosidase structurale (*lacZ*) et favorise la synthèse de protéines hybrides. Le phage λ gt11 possède des propriétés particulières qui lui permettent d'être un vecteur très utile pour l'expression recombinante. Il permet la construction et la maintenance de grandes banques d'ADN complémentaire (ADNc), il fait propager assez rapidement le fragment qu'il contient, il est inductible et permet la transcription rapide d'un nombre très élevé de copies du fragment d'ADN d'intérêt et enfin il apporte de la stabilité aux protéines qui y sont exprimées grâce leur fusion avec la β -galactosidase (Young and Davis, 1983).

L'identification des antigènes par immunocriblage se fait en deux grandes étapes. Premièrement, une banque d'ADNc est construite à partir de l'ensemble des ARNm

d'un tissu ou d'un agent infectieux dans un bactériophage à développement lysogénique (phage *lambda*, λ gt11). Les phages recombinants obtenus, sont utilisés pour transformer des souches *Escherichia coli*, résultant en la formation des plusieurs mutants lysogènes capables de produire des quantités détectables d'antigènes par induction avec de l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside). Les bactéries mutantes étant défectueuses de la dégradation de protéines, les antigènes s'accumulent. Deuxièmement, des anticorps spécifiques d'un ou plusieurs des antigènes, sont utilisés pour isoler les protéines recherchées (Magyezi et al., 2019, Müller et al., 1992, Young and Davis, 1983). Ces anticorps sont produits soit par l'immunisation d'un animal par une protéine codée par un ADNc ou à la suite de l'infection par l'agent pathogène dont on cherche à isoler les protéines immunodominantes. Cette stratégie a été employée avec succès pour identifier des protéines immunoréactives GM6 et MARP1 de *T. brucei gambiense* (Müller et al., 1992). Elle présente l'avantage d'être particulièrement sensible pour la détection des protéines immunoréactives et à motifs répétitifs comme évoqué précédemment. Par ailleurs, la disponibilité des algorithmes de bio-informatique facilite l'extrapolation des résultats entre organismes ou espèces proches. Dans une étude menée en 2019, une équipe a pu identifier par cette technique 6 antigènes de *T. brucei*. Par l'analyse comparative de l'homologie des séquences de ces protéines avec celles des bases données, une quarantaine d'autres protéines ont été identifiées comme étant putativement immunoréactives (Magyezi et al., 2019). Toutefois, en raison de l'abondance intrinsèque souvent très faible de certains gènes hautement régulés, cette technique peut s'avérer inefficace pour la détection de certains antigènes. De plus, la qualité des ADNc et donc des ARNm et des anticorps peut être limitante (Young and Davis, 1983).

3.3.2 Approche immunoprotéomique

Cette approche fait intervenir deux techniques majeures : l'immunoblotting et la spectrométrie de masse. Très utilisée pour identifier des antigènes des agents pathogènes, cette approche peut être employée de différentes façons (Boonjakuakul et al., 2007, Caraballo-Guzmán et al., n.d., Somda et al., 2013). La méthode la plus utilisée consiste à séparer les protéines totales provenant de l'extrait brut d'un organisme par une électrophorèse bi-dimensionnelle (2D SDS-PAGE) en fonction de leur poids molé-

culaire et de leur point iso-électrique. Par la suite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sur laquelle on les fait réagir avec plusieurs échantillons de sérums ou de plasmas de différents statuts (positif et négatif à l'agent pathogène). Les protéines reconnues spécifiquement sont excisées sur un gel réalisé en parallèle et sont identifiées par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse est une technique permettant de déterminer les masses moléculaires, d'identifier et de quantifier les composés analysés. Elle est fondée sur la séparation des protéines et des peptides en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z). Le spectromètre de masse, qui est l'appareil utilisé, comporte quatre parties dont une source d'ionisation suivie d'un ou plusieurs analyseurs séparant les ions produits selon le rapport m/z dans un champ électrique et éventuellement magnétique (accélération et séparation), d'un détecteur qui compte les ions et amplifie le signal, et enfin, d'un système informatique pour traiter le signal appelé spectre de masse. De nos jours, le spectromètre de masse est presque toujours couplée aux méthodes chromatographies en phase gazeuse et/ou en phase liquide (Menet, 2011). Il existe plusieurs sources d'ionisation et plusieurs types d'analyseurs. Par exemple, le MALDI-TOF est l'association de la source d'ionisation par désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) et un détecteur à temps de vol (TOF, *time of flight*). Enfin, la MS-MS qui constitue la méthode de spectrométrie en tandem, associe plusieurs analyseurs (deux) différents ou identiques. Pour l'application en protéomique, les protéines à analyser sont digérées en général par de la trypsine en peptides qui sont par la suite ionisés et analysés. En confrontant la séquence des peptides analysés à des bases données protéiques, les protéines seront ainsi identifiées (Menet, 2011) (Figure 3.1). L'immunoprotéomique est une excellente méthode d'identification des protéines d'intérêt. Cependant, sa complexité pousse souvent à employer des variantes moins lourdes et plus pratiques.

3.3.3 Immunoprécipitation couplée à la protéomique

Cette stratégie est l'une des approches protéomiques la plus fiable pour l'identification des antigènes candidats (notamment immunoréactifs) au diagnostic. Elle a permis d'identifier plusieurs protéines des trypanosomes. L'exemple le plus récent est la gly-

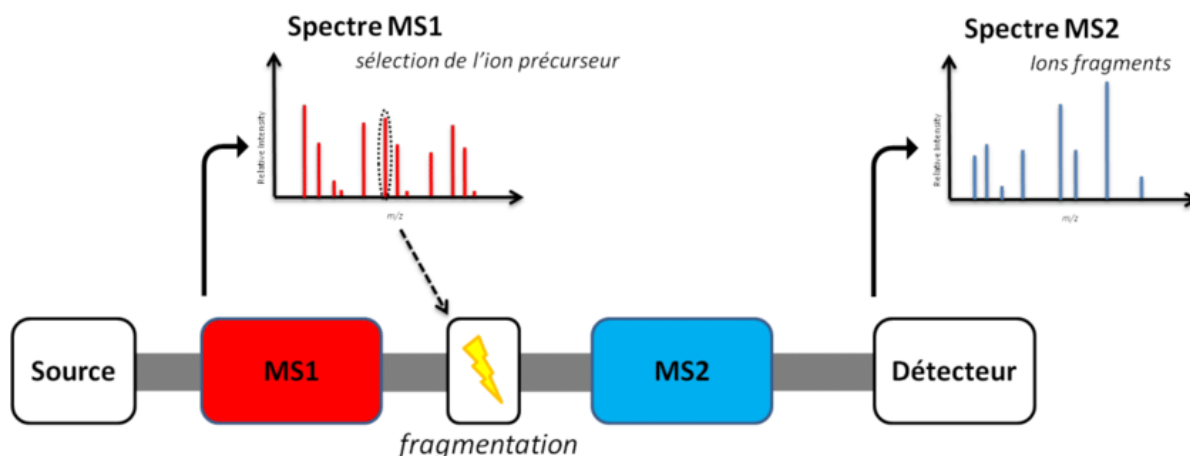


FIGURE 3.1 – Principe d'une expérience de spectrométrie de masse en tandem. Schéma tiré de Bilgraer (2014) (Bilgraer, 2014).

coprotéine invariante de surface Tc38630, identifiée par Fleming *et al.*, (2014) chez *T. congolense*. Une année plutôt, Sullivan *et al.*, (2013) ont également identifiée la protéine ISG65 chez *T. b. brucei* grâce cette approche. Les deux protéines testées en immunodiagnostic ont montré une excellente réactivité ce qui a rendu possible leur inclusion dans un test d'immunochromatographie.

Le principe de la technique a été parfaitement schématisé par Sullivan *et al.*, (2013) (Figure 3.2). La première étape consiste à isoler les antigènes à partir d'un lysat total par immunoprécipitation avec des anticorps immobilisés provenant d'animaux infectés et naïfs (contrôles). Les antigènes spécifiques récupérés après élution sont ensuite analysés sur gel SDS-PAGE à partir duquel ils sont excisés et identifiés par spectrométrie de masse comme précédemment décrit (Fleming *et al.*, 2014).

3.3.4 Protéomique couplée à l'immuno-informatique

L'étude protéomique, grâce à l'analyse de masse, est également utilisée en tant que telle pour l'identification des antigènes de trypanosomes. Cette approche est plus inclusive et permet de détecter à la fois les protéines immunogéniques et non immunogènes à la différence des autres. Plusieurs échantillons peuvent être analysés que ce soit un lysat total, un extrait de protéines organellaires, du secretome ou encore des échantillons de sérums ou plasma d'animaux infectés (Calomeno *et al.*, 2021, Holzmueller *et al.*, 2008). Après l'identification de protéines par la spectrométrie de masse (MS), une analyse comparative de leurs séquences suivie de la prédiction d'épitopes pour les

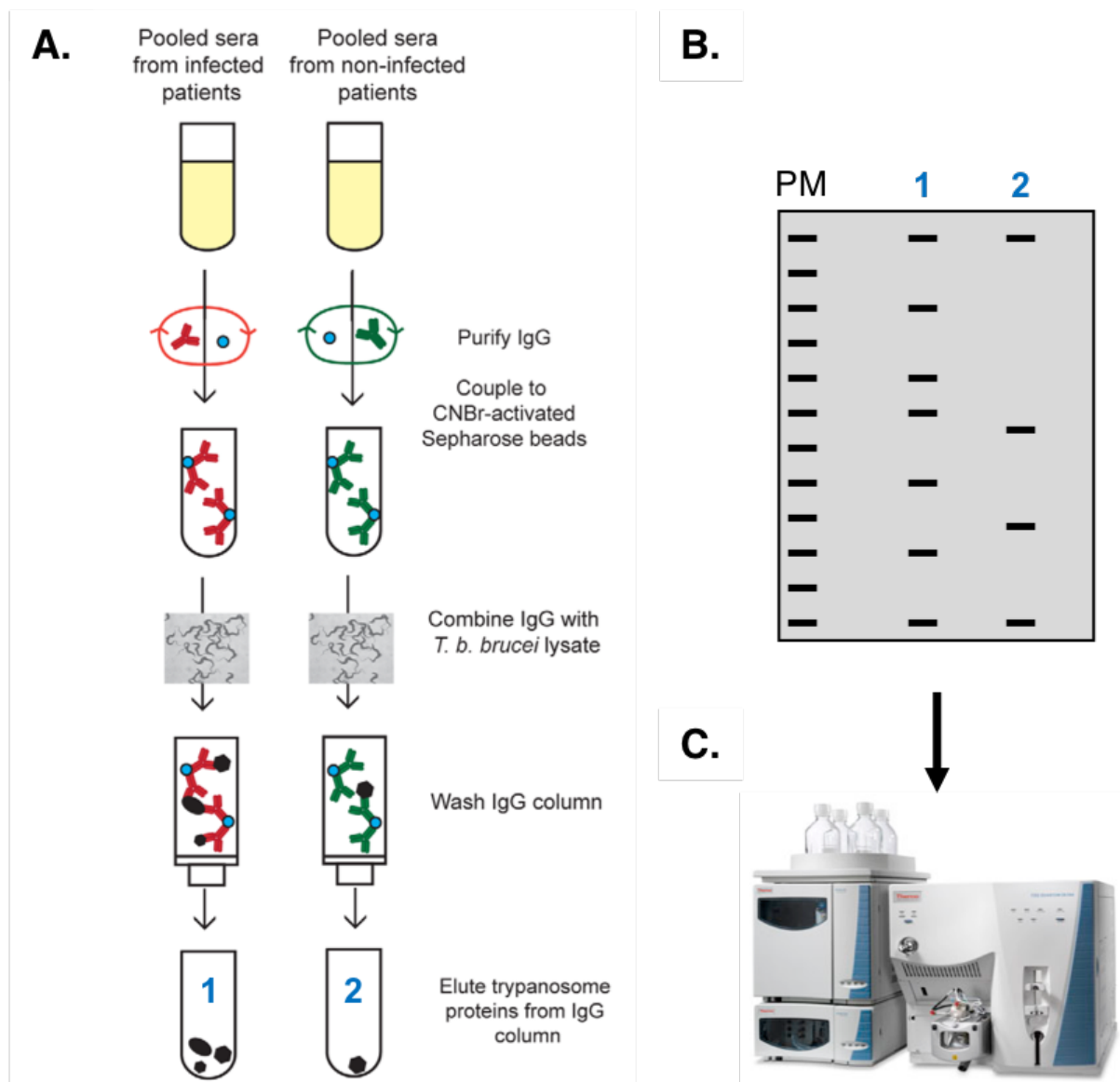


FIGURE 3.2 – Chromatographie d'immuno-affinité et identification d'antigènes à potentiel diagnostique. **A.** Préparation d'IgG-Sepharose à partir de sérums d'infection et de non-infection (contrôle) de *T. b. gambiense*, capture par immuno-affinité d'antigènes de trypanosomes à partir de lysat total au détergent, puis élution et concentration par précipitation à l'éthanol. **B.** Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie colloïdal des protéines éluées des IgG-Séparose d'infection (piste 1) et des IgG-Séparose de non-infection (contrôle) (piste 2). Les protéines de deux pistes sont excisées et analysées par LC-MS/MS après réduction, S-alkylation et digestion trypsique (**C.**). Les positions des marqueurs de poids moléculaire sont indiquées à gauche. Schéma adapté de Sullivan *et al.*, (2013) (Sullivan *et al.*, 2013).

lymphocytes B est réalisée grâce aux outils bio-informatiques (BepiPred, BEST, ABC-Pred, Scratch protein predictor, etc.) (Soria-Guerra et al., 2015). Les protéines présentant plus d'épitopes sont sélectionnées comme potentiellement immunogéniques et la quantification relative des résultats de la MS oriente l'identification d'antigènes abondants éventuellement utilisables dans les tests de détection d'antigènes. L'exemple parfait de l'application de cette approche est paru dans une étude très récente (Calomeno et al., 2021). Les auteurs ont identifié pas moins de 30 protéines parmi lesquelles il y avait une quatorzaine présentant des épitopes de cellules B.

En résumé, l'identification des antigènes est une étape indispensable à la mise en place d'outils d'immunodiagnosics et de stratégies de vaccination. Il existe plusieurs approches pour isoler, sélectionner et identifier des antigènes spécifiques et en général immunodominants. La plupart s'articule autour de la technologie d'analyse de masse qui était initialement une technique essentiellement utilisée en chimie avant son ascension dans l'étude des macro-molécules dans les années quatre-vingt (Menet, 2011). Cette technologie est coûteuse et n'est pas souvent accessible à tous les laboratoires, en particulier ceux impliqués dans la recherche contre les trypanosomoses animales africaines dans les pays du sud. Par ailleurs, les antigènes identifiés sont très souvent ceux mis en évidence précédemment. Ceci montre la nécessité de l'introduction d'une étape nouvelle pour augmenter la sensibilité de certaines techniques pour la détection de protéines d'immunoréactivité intermédiaire masquées par les protéines les plus représentées et les plus immunodominantes.

III |> Projet de recherche

4 | Les objectifs de la thèse

En considérant d'une part l'absence de vaccin et d'autre part le conditionnement des décisions de chimiothérapies à un diagnostic précis, on peut considérer le diagnostic comme l'un des éléments clés du contrôle de la TAA. Par ailleurs, du fait de la problématique liée à la standardisation des antigènes de sérodiagnostic, du problème d'accessibilité au petit nombre des tests existants, le développement des nouveaux tests devient plus que nécessaire.

Cette thèse visait à mettre au point de nouveaux outils innovants pour le diagnostic des trypanosomoses animales africaines. Les objectifs étaient de : (i) caractériser le potentiel diagnostique de certaines molécules cibles déjà identifiées et étudiées dans les laboratoires d'accueils, (ii) sélectionner à partir des données protéomiques et transcriptomiques des nouvelles cibles diagnostiques et évaluer leur potentiel diagnostique individuel mais surtout leur utilisation en combinaison/cocktail dans un test diagnostique unique, et enfin, (iii) identifier les protéines immunogéniques à partir d'analyse protéomique et immuno-informatique du sécrétome de *T. congolense*. Les deux premières activités ont consisté à cloner, exprimer, purifier et caractériser *in silico* les protéines candidates et à évaluer dans un test d'immuno-enzymatique leur immunogénicité. Dans la dernière activité, des nouvelles cibles ont été identifiées par la mise en application de l'approche protéomique couplée à une analyse d'immunoblotting et immuno-informatique.

Avec le présent chapitre, cette partie contient au total 5 chapitres. Les matériels et les méthodes utilisés pour l'ensemble des études menées, sont présentés dans le chapitre 5. Les chapitres 6, 7 et 8 présentent de façon détaillée et chronologique les résultats des travaux de recherche menés avec une structure en article pour chaque chapitre (introduction, matériels et méthodes, résultats et discussion). Enfin, une conclusion générale incluant les perspectives pour la poursuite de différents axes de re-

cherche de cette thèse, est présentée dans la dernière partie.

5 | Matériels et Méthodes

5.1 Matériels biologique

5.1.1 Espèces et souches de trypanosomes

Durant cette thèse, nous avons utilisé les formes sanguines des souches sauvages de trypanosomes de deux espèces : *Trypanosoma brucei brucei* et *T. congolense*. La souche de *T.b brucei* utilisée est la souche monophorique 427 qui a été originairement isolé en Ouganda chez un mouton en 1960 et transférée à l'Institut Lister de Londres en 1961, d'où son appellation de *Lister 427* (BEI-Resources, 2021). La souche de *T. congolense* utilisée (souche IL3000) est un clone de la souche ILC49 passé au travers des rongeurs, isolée à l'origine d'une vache du Transmara, Kenya (Wellde et al., 1974).

5.1.1.1 Milieux de culture

La souche sauvage de *T.b brucei* (Tb427 90.13 WT) a été cultivée dans le milieu IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) contenant de l'IMDM (Gibco 10184932), 3,024 g/L de bicarbonate de sodium (Euromedex 6885-1), 0,136 g/L d'hypoxanthine (Sigma H-9636), 0,11 g/L Pyruvate de sodium (Sigma P-3662), 0,039 g/L de thymidine (Sigma T-9250), 0,028 g/L d'acide bathocuproinedisulfonique (Sigma B-1125), 2 μ M de β -mercaptoéthanol (Sigma M-6250), 1,7 μ M de L-cystéine (Sigma C-1276), 10% de sérum de vœux fœtal (SVF, Gibco 106) decomplémenté et 10000 U de pénicilline et 20 mg de streptomycine. Deux antibiotiques supplémentaires ont également été ajouté : Neomycine et Hygromycine aux concentrations finales indiquées dans le Tableau 5.1.

Pour la culture de la souche *T. congolense* IL3000, nous avons utilisé le milieu de culture MEM (Minimum Essential Media) dont la base était de composition suivante : 9,6 g/L de MEM en poudre (Sigma M-0643), 5,96 g/L d'acide HEPES (Sigma-Aldrich

H3375), 2,2 g de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich S5761), 1 g de D-glucose (Sigma-Aldrich G8270), 110 mg pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich P-3662), 10,68 mg d'adénosine (Sigma-Aldrich A4036), 14 mg d'hypoxanthine (Sigma H-9636), 4 mg de thymidine (Sigma T-9250) et 14,1 mg d'acide bathocuproïne disulfonique (Sigma B-1125). À ce milieu de base, ont été ajoutés du sérum de chèvre (InvitroGen ref. 16210072), 200 μ M de β -mercaptoéthanol (Sigma M-6250) et 2 mM de glutamine (Sigma-Aldrich G8540).

TABLE 5.1 – Liste des antibiotiques utilisés

Antibiotique	Concentration finale	Référence
<i>Culture de trypanosomes</i>		
Hygromycine	5 μ g/mL	InvivoGen ant-hg-1
Néomycine	2,5 μ g/mL	InvivoGen ant-gn-1
Pénicilline	44 U	Sigma-Aldrich P4333-100 mL
Streptomycine	0,044 mg/mL	Sigma-Aldrich P4333-100 mL
<i>Culture de bactéries</i>		
Pénicilline	0,05 mg/mL	EUROMEDEX 10g-Ref. EU0400-C
Kanamycine	0,05 mg/mL	EUROMEDEX 10g-Ref. UK0010-C

5.1.1.2 Mise en culture et entretien de *T. brucei brucei* et de *T. congolense*

Pour leur mise en culture, les trypanosomes ont été décongelés à partir d'un stabilat stocké à -80 °C. Ils ont ensuite été comptés à l'aide du Guava EasyCyte Flow Cytometer (Merck millipore, ref.0500-5009) pour Tb427 90.13 WT ou d'un microscope optique en utilisant une cellule de Malassez pour TcIL3000. Un nombre de 10^3 parasites ont été inoculés dans une flasque de culture ventilée de 25 cm² contenant 5 ml de milieu de culture. Les parasites ont été par la suite incubés dans une étuve à des températures de 37 °C pour Tb427 90.13 WT et à 34 °C pour TcIL3000 WT, et dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Le maintien en culture des parasites a été réalisé ensuite en utilisant des plaques de culture cellulaire (plaque 24 puits pour *T. brucei brucei* et plaque 6 puits pour *T. congolense*). Pour chaque souche, 2×10^5 parasites ont été inoculés dans un puit contenant 1 ml de milieu. Une dilution sérielle (d'un facteur 10) a été effectuée à partir de

cette suspension pour passer de 2×10^5 parasites par puit à 20 parasites/ml par puit. Les parasites ont été incubés dans une étuve à 37 °C (*T. brucei brucei*) ou à 34 °C (*T. congolense*) et à 5% de CO₂.

5.1.2 Souches de bactéries

5.1.2.1 Souches et culture

Trois souches de la bactérie *Escherichia coli* ont été utilisées. La souche XL1 blue, ne possédant pas la machinerie nécessaire pour la dégradation d'ADN étranger, a été utilisée pour la biologie moléculaire (clonage). Les souche BL21 Star™ (DE3, Invitrogen, Saint-Aubin, France) et JM109 (DE3, Promega, France) ont été utilisées pour l'expression de protéines recombinantes. Ces deux souches possèdent le promoteur T7 inductible avec l'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) pour la sur-expression de protéines. Les bactéries ont toutes été cultivées avec le milieu lysogeny broth (LB) à la fois solide et liquide avec les antibiotiques de sélection : ampicilline ou kanamycine (Tableau 5.1).

5.1.2.2 Transformation de bactéries par les plasmides recombinants

Les différentes souches de bactéries ont été transformées de la façon suivante : un aliquote de 25 μ L d'une suspension de bactéries stockées à -80 °C a été décongelé sur glace. Les bactéries ont été transformées avec 10 à 20 μ L du mélange réactionnel de ligation pour le clonage et 100 mg de plasmide recombinant purifié pour l'expression de protéines. Le mélange a été incubé sur glace pendant 30 min (min) à la suite de laquelle les bactéries ont été exposées à un choc thermique à 42 °C pendant 45 sec (sec). La suspension a été placée sur glace pendant 2 min. Ensuite, 300 μ L de LB liquide sans antibiotique ont été ajoutés et les bactéries ont été placées à 37 °C pendant 1 h dans un incubateur avec agitation à 220 rpm (rotation par min). La suspension a par la suite été centrifugée à 2000 x g pendant 5 à 10 sec. Les bactéries ont été étalées sur milieu LB solide avec les antibiotiques de sélection (en fonction du vecteur) dans 2 boîtes de pétri : 50 μ L sur la première boîte de pétri et le reste sur une seconde boîte à l'aide de billes de verres. Les boîtes ont ensuite été placées à 37 °C pour la croissance de colonies.

5.1.3 Les vecteurs d'expression et de clonage

Les vecteurs de clonage (également d'expression) utilisés au cours de ma thèse et leurs caractéristiques sont résumés dans le Tableau 5.2. Ils sont tous inductibles avec l'IPTG. Après induction, les bactéries transformées avec ces plasmides expriment une protéine de fusion incluant le produit du gène étranger inséré et la protéine « marqueur » du plasmide (tag) qui permet de purifier la protéine de fusion. Ils ont tous été utilisés exclusivement pour l'expression hétérologue de protéines chez les bactéries même si le plasmide pETSUMO est utilisable pour le clonage et l'expression de protéines chez la levure.

TABLE 5.2 – Les vecteurs de clonage et d'expression bactériens.

Vecteur	Résistance	bp	Caractéristiques	Référence
pGEX4T-1	Ampicilline	4950	Tag GST en aval du site MCS, site de clivage thrombine et promoteur Ptac	GE Healthcare 28-9545-49
pTE28 α	Kanamycine	5368	Tag N-ter 6xHis, promoteur T7 et site de clivage thrombine	Sigma-Aldrich 69864
pETSUMO	Kanamycine	5600	Tag N-ter SUMO et 6xHis, promoteurs T7 et lacO et site de clivage SUMO	ThermoFischer SCIENTIFIC K30001
pMAL-cRI	Ampicilline	6148	Tag N-ter MBP, promoteur Ptac, site de clivage au facteur Xa	New England Biolabs

GST : Glutathion S-transférase ; MCS : Multicloning site (site de clonage) ; MBP : Maltose binding protein

5.1.4 Les oligonucléotides synthétiques

Les oligonucléotides utilisés dans ce travail notamment pour le clonage et l'expression de protéines candidates au diagnostic sérologique sont présentés dans le Tableau 5.3. Ils ont été synthétisés et fournis par Eurofins Genomics (France). Les solutions stocks ont été fournies à une concentration de 100 μ M. Pour le clonage de gènes, des séquences spécifiques « linkers » contenant des sites de restriction des enzymes ont été ajoutés aux extrémités 5' de chaque amorce. Pour faciliter la digestion de produits d'amplification par PCR, 2 à 3 nucléotides ont été ajoutés aux séquences « linkers » au niveau des extrémités 5'. Les amorces conçues sur les séquences de promoteur et

TABLE 5.3 – Liste des oligonucléotides pour clonage, expression et séquençage.

Nom	Séquence (5' - 3')	Cible
<i>Clonage et expression</i>		
TbbPLa1b-pGEX-Fw	AGCTCGAGATGTTTGGCACGCCGTTGAGAAT	TbPLA-1b
TbbPLa1b-pGEX-Rv	AGGCGGCCGCTTACGATTTTCGATGAAGGTCCGG	
fw-TbBiP-SacI	AAAAGTCGACCAGCACCCGAAAGTGGCGGCAAGG	TbBiP
rev-TbBiP-XhoI	AAAACCTCGAGACTTACAGATCGTC CATGGGTTGTG	
fw-TcBiP-BamHI	AAAGGATCCGCGCCCGAGAGCGGC GGAAGGTG	TcBiP
rev-TcBiP-EcoRI	AAAGAATTCTTAAAGGTCATCCATGGGCTGCGG	
fw-TvBiP-BamHI	AAAGGATCCGCGCCCGAGGCGAGC GGAAGGTG	TvBiP
rev-TvBiP-EcoRI	AAAGAATTCTTACAGGTCGTGCATCGGCTGCGG	
fw-TbCP-EcoRI	AAAGAATTCGCGTGCCTTGCGTCTGTGCACTC	TbCATL
rev-TbCP-XhoI	AAACTCGAGTCACTGGTGTGGGACCAGCCTGGC	
rev-TbCP-NotI	AAAAGCGGCCGCTGGTGTGGGACCAGCCTGGCCG	
fw-TcCP-EcoRI	AAAGAATTCGCGTGCTTTGTTCCCGTGGCGTTG	TcCATL
rev-TcCP-XhoI	AAACTCGAGTCACTCGTGCCGCACGAGCCGGGC	
rev-TcCP-NotI	AAAAGCGGCCGCTCGTGCCGCACGAGCCGGGCGG	
fw-TvCP-EcoRI	AAAGAATTCGCGCCTGCTGCCATGGCGGTGCTG	TvCATL
rev-TvCP-XhoI	AAACTCGAGCTAGTTGCAGTGGTACGTTGCCGA	
rev-TvCP-NotI	AAAAGCGGCCGCGTTGCAGTGGTACGTTGCCGACA	
fw-TvcMDH-EcoRI	AAAGAATTCTCGTGCAAACGTGTTGTTGTAACG	TvcMDH
rev-TvcMDH-NotI	AAAAGCGGCCGCTCAGAGCGCCTGTGCGCGCTCTTCAAG	
TcoG3PDH-Fw	GCGGATCCTGTGAATCTGTGTGTCAGTTTGGC	TcG3PDH
TcoG3PDH-Rev	GCGTCGACTTACATCTTCGAAAGCCGAGGG	
TcoRHS2-Fw	GCGGATCCATGGAAGGGCGGGGAGCAAAGC	TcRHS2
TcoRHS2-Rev	GCGTCGACTCAGCGAGATCCGTATCATTAGCAG	
TcoHyp-Fw	GCGGATCCACGAATCTTGA AAAAGGATGAAC	TcIL3000_4_3690
TcoHyp-Rev	GCGTCGACTCACTCATAAACTGCACTCATGTGC	
TcocMDH-Fw	AAAGAATTCTCGTGCAAACGTGTTGTTGTAACG	TccMDH
TcocMDH-Rev	AAAAGCGGCCGCTCAGAGCGCCTGTGCGCGCTCCTC	
<i>Séquençage</i>		
T7-Pro-primer	GTAATACGACTCACTATAGGC	Promoteur T7
T7-Ter-primer	CTAGTTATTGCTCAGCG	
pGEX-MCS-fw	TCGGATCTGGTTCCGCGT	Site MCS de pGEX
pGEX-MCS-rev	GTCATCACCGAAACGCGC	

fw (forward ou amorce sens) ; rev (reverse ou amorce anti-sens)

en aval du site de multiclonaage ont été utilisées pour le séquençage des inserts dans les différents plasmides.

5.1.5 Origines des échantillons de sérums

Des échantillons de sérums de différentes origines ont été utilisés dans ce projet (Tableau 5.4). Pour l'évaluation de protéines recombinantes utilisées en diagnostic sérologique (Chapitres 6 et 7) plusieurs types de sérums ont été employés. Les échantillons de sérums de souris prélevés avant infection (3) et après infection (18) ont été les premiers testés. Deux collections principales de sérums de bovins du CIRDES ont été utilisées : des sérums d'infection expérimentale fournis par Dr. Zakaria Bengaly et des sérums de terrain fournis par le Pr. Alain Boulangé. Les sérums expérimentaux ont été obtenus lors de l'étude de l'efficacité de certains trypanocides, menée en 2014 par GALVmed (Global Alliance for Livestock Veterinary Medicine) au CIRDES. Dans cette étude, les animaux ont été infectés expérimentalement par des souches de *T. congolense* et *T. vivax* isolées dans différents pays d'Afrique de l'Ouest. Pour notre étude, nous avons testé en ELISA sur les antigènes totaux de *T. congolense* 100 échantillons prélevés avant l'infection et 100 échantillons prélevés après l'infection et avant le traitement par trypanocides. A partir de ce test, 37 échantillons infectés par *T. congolense* et 31 échantillons non infectés ont été sélectionnés. Des sérums de terrain ont également été sélectionnés sur la base des données ELISA et PCR lors de la mission de terrain TAA-2019 au CIRDES. Cette étude avait pour but d'établir le statut épidémiologique dans certaines localités du Burkina Faso pour la TAA. L'ELISA réalisé sur les antigènes totaux de 3 espèces de trypanosomes (*T.b brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*) et la PCR réalisée avec des amorces pan-trypanosomiques et d'autres spécifiques de chaque espèce ont permis de sélectionner 37 échantillons positifs avec une infection mixte et naturelle de *T. brucei brucei*, *T. congolense* et *T. vivax* et 31 échantillons négatifs. De plus, 10 échantillons infectés par *T.b brucei* et 4 sérums bovins non infectés ont également été fournis par le CIRDES, ainsi que des plasmas humains positifs pour *T.b gambiense* (en ELISA et en immuno-trypanolyse sur les antigènes LiTat1.3/1.5), aimablement fournis par le Dr Jacques Kaboré (CIRDES, Burkina Faso) et le Dr Vincent Jammoneau (UMR InterTryp Montpellier) du projet DiTECT-HAT.

Pour l'étude de la réponse anticorps de différentes races bovines vis à vis du sé-

TABLE 5.4 – Origine des échantillons de sérums testés.

Statut	Hôte	Trypanosome	DPI	Nombre	Source	Année
<i>Sérums de souris</i>						
Naïve	BalbC	Tc IL1180	-7	1	UMR-5234-MFP	2007
	SwissC	Tv 1486	-7	1	UMR-5234-MFP	2007
	BalbC	Tbg 1166	-7	1	UMR-5234-MFP	2005
infecté	BalbC	Tc IL1180	7 - 29	6	UMR-5234-MFP	2007
	SwissC	Tv 1486	7 - 60	4	UMR-5234-MFP	2007
	BalbC	Tbg 1166	12 - 65	8	UMR-5234-MFP	2005
<i>Sérums expérimentaux de bovins</i>						
ELISA						
Naïve	Bovin	Tc IL1180	-4 - 0	100	CIRDES (GalVmed)	2014
	Bovin	Tbb	-9 - 0	8	CIRDES	2012
Infecté	Bovin	Tc IL1180	18 - 65	100	CIRDES (GalVmed)	2014
	Bovin	Tbb	15 - 128	20	CIRDES	2012
Immunoblotting						
Naïve	Zébu	Tc IL1180	-2	5	Intertryp (AATTOL)	2012
	Borgou	Tc IL1180	-2	5	Intertryp (AATTOL)	2012
	Lagunaire	Tc IL1180	-2	5	Intertryp (AATTOL)	2012
	N'Dama	Tc IL1180	-2	5	Intertryp (AATTOL)	2012
Infecté	Zébu	Tc IL1180	20 - 60	20	Intertryp (AATTOL)	2012
	Borgou	Tc IL1180	20 - 60	20	Intertryp (AATTOL)	2012
	Lagunaire	Tc IL1180	20 - 60	20	Intertryp (AATTOL)	2012
	N'Dama	Tc IL1180	-2	20	Intertryp (AATTOL)	2012
<i>Sérums de bovins collectés sur terrain</i>						
Négative	Bovin	Tc/Tbb/Tv	PCR/ ELISA	31	CIRDES	2019
Positive	Bovin	Tc/Tbb/Tv	PCR/ ELISA	37	CIRDES	2019
<i>Sérums humains</i>						
Négative	Humain	Tbg	ELISA	10	CIRDES (DiTECT)	2017
Positive	Humain	Tbg	ELISA	10	CIRDES (DiTECT)	2017

Tc (*T. congolense*); Tv (*T. vivax*); Tbb (*T.b brucei*); Tbg (*T.b gambiense*); DPI (Day Post-Infection); naïve (non infecté)

crétome de *T. congolense*, les sérums du projet AATTOL (ANR jeunes chercheurs) ont été utilisés (Tableau 5.4 Immunoblotting). Ces échantillons ont été collectés lors d'une étude de comparaison du phénotype trypanotolérant/susceptible de cinq races locales d'Afrique de l'Ouest qui diffèrent par leur histoire démographique (Berthier et al., 2015). Au cours de cette étude, 36 individus appartenant à la race taurine à longues cornes N'Dama, à deux races taurines à courtes cornes Lagune (LAG) et Baoulé (BAO), au Zébu Peul (ZFU) et au Borgou (BOR), une race mixte entre bovins trypanotolérants (AFT) et bovins trypanosusceptibles (AFZ), ont été infectés par *Trypanosoma congolense* IL1180 selon l'approbation du protocole expérimental « Project no. A002-2013/CE-CM » du Comité d'éthique Burkinabé. Pour cette thèse, nous avons utilisé les sérums de quatre races (ZFU, BOR, NDA et LAG). Pour chaque race, cinq individus ont été sélectionnés et pour chaque individu, un échantillon de pré-infection (-2) et quatre échantillons post-infection aux dates (20, 26, 33 et 60) ont été sélectionnés. Ainsi, la réponse anticorps pour chaque race et animal contre les protéines du sécrétome de *T. congolense*, a été analysée avant le pic d'anticorps IgG (20), au pic d'anticorps IgG (entre 26 et 33) et après le pic d'anticorps IgG (60).

5.1.6 Les antigènes de références

Nous avons utilisé plusieurs antigènes comme contrôle pour l'évaluation du potentiel diagnostique de protéines recombinantes testées au cours de cette thèse. Les antigènes de références actuellement recommandés par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) pour la TAA sont les lysats totaux solubles de trypanosomes (OIE-Terrestrial-Animals-2019, n.d.). Deux types de lysats antigéniques ont été utilisés : TcWTL (*T. congolense* whole trypanosoma lysate ou lysat total de *T. congolense*) et TbWTL (lysat total de *T.b brucei*). Ils ont été fournis par le CIRDES et brièvement préparés comme suit : les parasites ont été cultivés *in vivo* chez des rats. Lorsque la parasitémie a atteint un niveau élevé, les animaux ont été sacrifiés et les parasites ont été collectés dans le sang des rongeurs et séparés des composants sanguins par chromatographie d'échange d'anions sur une colonne DEAE (diéthylaminoéthyle). Les trypanosomes purifiés ont ensuite été lysés par plusieurs cycles de congélation/décongélation et soniqués dans un tampon phosphate contenant du glucose. Les antigènes solubles pour ELISA ont été séparés des éléments particuliers par centrifugation et

les lysats totaux ont été dosés par la méthode calorimétrique du BCA (BiCinchoninic acid Assay).

Nous avons également utilisé une protéine recombinante immunoréactive qui a servi d'antigène pour développer un test TDR (Test de diagnostic rapide) (Boulangé et al., 2017). Il s'agit de la cathésine B1 de *T. congolense* (cathepsin B-Like protease 1) nommée CB1 et initialement caractérisée en 2008 au laboratoire MFP-UMR-5234 à Bordeaux (Mendoza-Palomares et al., 2008). Cet antigène purifié a été fourni par notre laboratoire.

5.1.7 Les anticorps primaires et secondaires (conjugués)

TABLE 5.5 – Anticorps primaires et secondaires utilisés.

Anticorps	Produit dans	Type	Source/ref.	Dilution
<i>Anticorps primaires</i>				
anti-TbPLA-1b	Lapin	Polyclonal	L. RIVIÈRE	1/1000
anti-TbGK	Lapin	Polyclonal	F. BRINGAUD	1/5000
anti-PFR	Lapin	Polyclonal	F. BRINGAUD	1/10 000
<i>Anticorps secondaires : conjugués à la HRP</i>				
anti-lapin	Chèvre	Polyclonal	Promega, ref. W4011	1/2500
anti-souris	Chèvre	Polyclonal	KPL, ref. 074-18-061	1/1000 - 1/5000
anti-bovine	Lapin	Polyclonal	Sigma-Aldrich A8917	1/1000 - 1/10 000
anti-bovine	Chèvre	Polyclonal	KPL 14-12-06	ELISA : 1/500 - 1/2500; WB : 1/2500 - 1/10 000
anti-bovine	Mouton	Polyclonal	BioRad ref. AAI23P	1/100 - 1/30 000
anti-humain	Chèvre	Polyclonal	Jackson ImmunoResearch ref. 109-035-003	1/5000 - 1/100 000

Pour les expériences d'immuno-détection et plus particulièrement le western blot, nous avons utilisé trois anticorps primaires tous fournis par notre laboratoire : anti-TbPLA-1b, anti-TbGK et l'anti-PFR (Tableau 5.5 anticorps primaires). Pour l'ensemble de techniques d'immuno-détection, les anticorps secondaires utilisés sont tous couplés à la peroxydase (HRP, Horseradish peroxidase), et sont résumés dans le tableau 5.5 (anticorps secondaires).

5.2 Méthodes

5.2.1 Techniques de biologie moléculaire

5.2.1.1 Extraction et purification de l'ADN

5.2.1.1.1 ADN génomique des trypanosomes

À partir d'une culture *in vitro* à croissance exponentielle, les trypanosomes ont été comptés et 1×10^8 cellules ont été récoltées par centrifugation pendant 10 min à 1 200 g. Après une étape de lavage avec 1 mL de PBS1x et une deuxième étape de centrifugation, le culot a été doucement remis en suspension dans 150 μ L de tampon de lyse TELT (50 mM Tris-HCl pH8, 62,5 mM EDTA pH9, 2,5M LiCl, 4% [v/v] Triton X-100), mélangé par inversions 3 à 5 fois sans vortex et incubé 5 min à température ambiante. Ensuite, 150 μ L de Phénol :Chloroforme :Alcool isoamylique (PCIA) 25 :24 :1 ont été ajoutés à la suspension et mélangés par inversion. Le mélange phénol :chloroforme a été utilisé pour séparer les protéines (qui se retrouveront dans la phase organique et l'interphase) des acides nucléiques qui se retrouvent dans la phase aqueuse. L'alcool isoamylique a été utilisé pour éviter la formation de mousse. Ce mélange a été centrifugé pendant 5 min à 13 000 g. La phase aqueuse supérieure (contenant l'ADN) a été placée dans un autre tube et 300 μ L d'éthanol à 100% (EtOH) ont été ajoutés pour précipiter l'ADN en inversant doucement le tube pendant 15 sec ; l'ADN est alors devenu visible. L'ADN a été culotté par centrifugation pendant 10 min à 13 000 g. Le culot a été séché à l'air pour éliminer l'EtOH résiduel et remis en suspension dans de l'eau désionisée (dH₂O).

5.2.1.1.2 ADN plasmidique bactérien

L'extraction et la purification d'ADN plasmidien recombinant ou non recombinant ont été réalisées en trois étapes majeures : la lyse cellulaire, l'élimination des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique et l'élution. Pour cribler les clones recombinants au cours du clonage, nous avons utilisé le protocole « MiniPrep Express™ Matrix » pour lequel la composition de différentes solutions d'extraction est connue. Avec ce protocole, 1 mL de culture bactérienne a été centrifugée et 300 μ L de tampon STET (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 5% Triton X-100) et 25 μ L de lysozyme 10 mg/mL (dans 10 mM Tris pH 8) ont été ajoutés au culot. La suspension a

été incubée 5 min sur glace puis bouillie pendant 1 min au Bain-marie. Après une centrifugation de 10 min, le surnageant a été transféré dans un autre tube et mélangé avec 400 μ L de la solution de Miniprep Express MatrixTM (matrice de silice) qui lie l'ADN. Le mélange a été centrifugé 10 sec et le surnageant décanté. Le complexe MatrixTM/ADN a été lavé avec 500 μ L d'éthanol 80%. Après le lavage, l'éthanol a été aspiré et le plasmide a été élué avec de l'eau désionisée (dH₂O). Pour les Midiprep (volume de la culture bactérienne allant jusqu'à 100 mL), nous avons utilisé les kits QIAGEN Plasmid et le kit NucleoSpin® Plasmid (MACHEREY-NAGEL).

5.2.1.1.3 Purification des produits de PCR ou de digestion enzymatique

La résine S-300 (dans 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 7,5) a été utilisée pour purifier les produits de PCR et de restriction enzymatique pour le clonage. Sept cents μ L de résine ont été chargés dans une colonne (micro spin Biorad) et la colonne a été centrifugée pendant 1 min à 700 x g ; la colonne a été retirée du tube de collecte et mise dans un nouveau tube de 1,5 mL. La réaction PCR ou de restriction enzymatique a été ajoutée sur la résine et celle-ci a été centrifugée pendant 2 min à 700 x g. Le produit purifié a été récupéré dans l'éluat. La résine a été retirée et jetée de la colonne qui a été recyclée. Les kits GFX (Amersham Pharmacia Biotech) et PCR clean-up de Macherey-Nagel dont les principes reposent sur l'utilisation d'une matrice en silice, ont également été utilisés pour purifier les produits PCR et de digestion enzymatique.

5.2.1.1.4 Quantification d'ADN

La concentration d'ADN a été évaluée en mesurant l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (FluoStar Omega-BMG Labtech) en considérant que, à A₂₆₀ nm, une absorbance de 1 correspond à 50 μ g/mL d'ADNdb (40 μ g/mL d'ARNs). La pureté a été déterminée en mesurant l'absorbance à 280 nm pour évaluer la contamination protéique et en calculant le rapport A₂₆₀/280. Un rapport d'environ 1,8 signifie que l'ADN est pur.

5.2.1.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR classique a été réalisée pour l'amplification de gènes à partir d'ADN génomique ou de plasmides recombinants. La réaction de PCR a été réalisée avec un protocole spécifique à chaque gène cible et avec différentes polymérases (de fidéli-

tés variables). Les différents protocoles utilisés sont en annexe (Annexe 1 [page 181](#)). Brièvement, la réaction a été effectuée dans un mélange réactionnel dont les composants sont fournis dans un kit et contenant : du tampon de la polymérase, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 μ M de chaque amorce, 1 U/100 μ L de polymérase et 10 pg à 10 ng de matrice d'ADN et de l'eau miliQ. L'ADN a été amplifié dans un thermocycleur, après une première étape de dénaturation à 94-98°C pendant 5 min, en 35 cycles : 94-98°C, 15-30 sec (dénaturation) ; 56-70°C, 30 sec (hybridation d'amorces) ; 68-72°C 4 min (extension). À la fin de l'amplification cyclique, le produit amplifié a été conservé à 4°C.

5.2.1.3 Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose a été utilisée pour séparer en fonction de leur taille les fragments d'ADN amplifiés par PCR. Le gel de 1% a été préparé en solubilisant 1 g d'agarose (Eurobio BIO-41025) dans 100 mL de tampon TBE 1x (Tris borate EDTA, EUROMEDEX). La suspension a été bouillie puis refroidie, additionnée de BET (Bromure d'éthydiu) avant d'être coulée sur une cuve support. Les échantillons ont été mélangés à un tampon de charge (6X DNA Loading Dye, ThermoFischer ref. R1151) puis chargés dans le gel et les fragments ont été séparés à 100V pendant 15 à 30 min. L'ADN a ensuite été visualisé sous UV.

5.2.1.4 Clonage de gènes pour expression en système bactérien

La technique principale de clonage employée au cours de cette thèse, est le clonage directionnel avec ligation par la T4 DNA Ligase (New England BioLabs, M0202). L'ADN Ligase T4 catalyse la liaison de deux brins d'ADN entre le 5'-phosphate et les groupes 3'-hydroxyles de nucléotides adjacents dans une configuration à extrémités cohésives (ou à extrémités non cohésives). Les différentes étapes de cette technique sont illustrées dans la figure 5.1. Premièrement, une séquence d'intérêt (d'un gène donné) a été amplifiée par la technique de PCR en utilisant des amorces spécifiques (Tableau 5.3) synthétisées avec des séquences de « linkers » au niveau des extrémités 5' (i). Ces séquences « linkers » contiennent à leur tour des sites de restriction pour des endonucléases de type II qui reconnaissent et coupent des séquences palindromiques spécifiques. Le produit de PCR (insert) et le vecteur plasmidien ont été digérés par un couple d'endonucléases générant des extrémités cohésives à bout 5'

sortants à la fois sur l'insert et sur le plasmide (ii). Les produits de digestion ont été purifiés des éléments réactionnels comme précédemment décrit (iii, voir paragraphe 5.2.1.1.3). L'insert et le plasmide (ratio de 3 :1) ont été mélangés avec l'enzyme T4 ADN ligase dans un volume final de 20 μ L de tampon de ligation. Le mélange réactionnel a été incubé à température ambiante pendant 10 à 20 min pour la ligation des extrémités cohésives puis la réaction a été stoppée à 65 °C pendant 10 min (iv). Après refroidissement, le mélange réactionnel a été utilisé pour transformer les bactéries XL1 blue compétentes (50 μ L) par choc thermique (voir sous-sous-section 5.1.2.2) (v). Les différents mélanges réactionnels sont présentés en annexes (Annexe 3 page 185).

Les clones, positifs, c'est-à-dire ayant intégrés le plasmide recombinant, ont été sélectionnés (Figure 5.1 vi) par deux méthodes. La méthode classique a consisté à extraire et à digérer le plasmide recombinant par le même couple d'endonucléases qui ont servi au clonage. L'insert libéré a ensuite été détecté sur gel d'agarose en fonction de la taille attendue. La seconde méthode est basée sur une amplification par PCR directement sur la colonie bactérienne. Pour réaliser cette dernière, une colonie de culture a été prélevée (« piquée ») et ajoutée au mélange réactionnel de la PCR spécifique du gène cloné (Annexe 2 page 184). Un couple de primers, comportant une amorce conçue pour s'hybrider sur la séquence promotrice du plasmide (amorce sens) et une autre sur la séquence de l'insert (amorce anti-sens), a été utilisé pour détecter spécifiquement la présence du fragment d'ADN étranger (voir amorces : Tableau 5.3).

5.2.1.5 Séquençage de fragments d'ADN

Pour s'assurer que (i) la réaction de PCR (avant clonage) n'a pas induit de mutation pouvant entraîner une absence de codon de départ (« start ») ou d'arrêt (« stop ») ou un décalage de cadre de lecture, et que (ii) la ligation s'est faite correctement, tous les plasmides ont été séquencés. Brièvement, 15 μ L de plasmide (100 ng/mL) ont été mélangés avec 2 μ L d'une amorce (10 μ M) pour la réaction de séquençage dans le kit SmartSeq (Eurofins Genomics). La réaction de séquençage de cycle, basée sur le séquençage Sanger, a été réalisée par Eurofins et les séquences obtenues ont été analysées avec le logiciel Geneious 4.8.5.

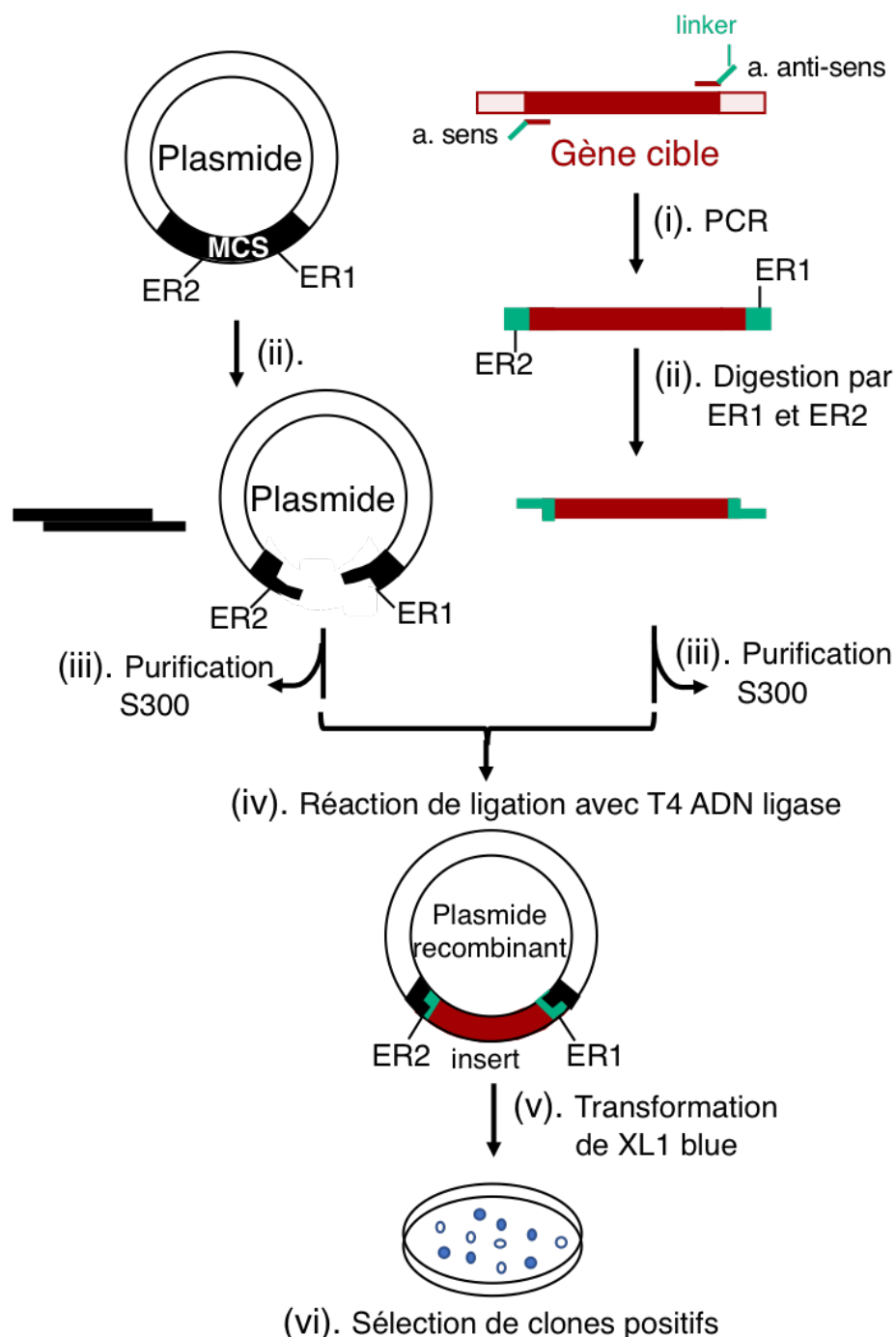


FIGURE 5.1 – Les étapes du clonage directionnel par ligation des extrémités cohésives. Les étapes du clonage : (i). amplification de du gène cible par PCR ; (ii). Digestion enzymatique, (iii). Purification du produit de digestion ; (iv). Ligation des extrémités cohésives ; (v). Transformation de bactéries *E. coli* XL1 blue ; (vi). Sélection des clones ayant intégrés le plasmide recombinant. MCS : Multicloning site (site de multiclonage) ; ER1, ER2 : Enzyme de restriction (endonucleases type II) ; a. sens (amorce sens) ; a. anti-sens (amorce anti-sens).

5.2.2 Techniques biochimiques

5.2.2.1 Expression et purification de protéines recombinantes

5.2.2.1.1 Expression des protéines recombinantes

Au cours de cette thèse, nous avons cloné plusieurs gènes dans différents plasmides (Tableau 5.2). Chaque gène a été cloné en phase avec un marqueur ou « *carrier* » appelé « tag ». La stratégie de purification de protéines utilisée, était basée sur la chromatographie d'affinité pour le tag en fusion avec les protéines d'intérêt. Le tag étant différent d'un plasmide à un autre, l'exécution de la chromatographie d'affinité était différente d'une protéine à une autre. À la suite du clonage (sous-sous-section 5.2.1.4), les plasmides recombinants ont été purifiés et les souches *E. coli* BL21 StarTM et JM109 ont été transformées avec ces plasmides. À la veille de la purification des protéines recombinantes, des colonies « positives » ont été piquées et mise en pré-culture sur la nuit dans 10 mL (par colonie) de LB à 37°C, 200 rpm. Le lendemain, les bactéries ont été amplifiées dans 100 mL de LB inoculés par 2 mL de la pré-culture à 37°C (ou à 30°C pour les protéines purifiées en Afrique) jusqu'à une densité optique (DO) à 600 nm comprise entre 0,6 et 0,8. L'expression protéique a ensuite été induite par l'ajout d'isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) à une concentration finale de 1 mM, pendant 3 h à 37°C sous agitation à 200 rpm. Les bactéries ont ensuite été récoltées par centrifugation à 4000 x g pendant 10 min, et les culots ont été conservés à -20°C.

5.2.2.1.2 Purification des protéines solubles

Pour tester la solubilité des protéines, les bactéries ont été lysées par 3 cycles de congélation/décongélation et sonication (sur la glace : 3x 20 pulses et 30 sec de pause, Branson Sonifier 250) après une incubation de 30 min sur glace, dans quatre tampons de lyse différents : le PBS-lysozyme (PBS1x, lysozyme 100 μ g/mL), le TGTe (50 mM Tris-HCl, 10% Glycérol, 0,1% Triton x100, 1 mM EDTA et 100 μ g/mL Lysozyme), le tampon TNE (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1mM EDTA et 100 μ g/mL Lysozyme) et tampon TNE-U (tampon TNE avec de l'urée 1 M). L'extraction par le tampon Bugbuster (MERCK Millipore, ref. 70584) a également été testé. La suspension a été centrifugée pendant 30 min à 10 000 g à 4°C et le culot a été séparé du surnageant (fractions solubles). Les échantillons ont été analysés par SDS-PAGE (sous-sous-section 5.2.2.2) puis conservés à -20°C. Après que leur solubilité ait été déterminée et en fonction du

tag avec lequel elles ont été exprimées, les protéines solubles ont été purifiées comme suit :

Pour les protéines avec le tag GST (Glutathion S-transférase), le surnageant, clarifié après lyse de bactéries dans le PBS-lysozyme, a été chargé sur une colonne de résine de glutathion Sepharose 4B (GE Healthcare, Chicago, IL, États-Unis) préalablement équilibrée avec du PBS et placée sur un rotateur à 6 rpm pendant une nuit à température ambiante. La colonne a ensuite été lavée avec dix fois le volume de PBS en utilisant uniquement la gravité. Les protéines ont été éluées de deux manières : par compétition en utilisant le glutathion (GSH) libre qui a plus d'affinité pour la GST et par clivage à l'aide d'une protéase (thrombine). Cette dernière méthode a été privilégiée pour limiter l'interférence de la GST dans les tests d'immuno-détection. Ainsi, Cinq unités de thrombine ont été ajoutées à la colonne, qui a été remise sur le rotateur pendant une nuit à 30 rpm à température ambiante. Nous avons laissé la suspension sédimenter et les fractions contenant les protéines clivées ont été recueillies par gravité et conservées à 4 °C avec un cocktail d'inhibiteurs de protéase 1x (Roche, Basel, Suisse).

Les protéines fusionnées au tag 6xHis ont quant-à-elles été purifiées en utilisant la résine de nickel (HisPur™ Ni-NTA ref. 88221, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) selon les instructions du fabricant. Cette technique est basé sur l'affinité des ions nickel divalent pour l'histidine (His). L'imidazole qui a également une forte affinité pour la résine, a été utilisé pour faire éluer la protéine de fusion par compétition.

Deux tronctions de la protéine BiP (Binding immunoglobulin protein) de *T. congolense* utilisées dans cette thèse ont été fournies par le Pr. Alain Boulangé et ont été précédemment clonées dans le plasmide pMAL en phase avec la MBP (Boulangé, 1995, Boulangé et al., 2002). Pour leur purification, nous avons utilisé la résine d'amylose selon les instructions du fabricant (Amylose Resin, NEB, UK). Pour cette résine, la purification est basée sur l'affinité de la MBP à se lier au maltose (remplacé ici par de l'amylose). L'éluion est réalisée par compétition entre le maltose libre et l'amylose immobilisé pour le site de liaison de la MBP.

5.2.2.1.3 Purification des protéines insolubles

En ce qui concerne les protéines insolubles, nous avons d'abord purifié les corps d'inclusions puis les protéines ont été solubilisées en utilisant un tampon chaotropique. Pour ce faire, un culot bactérien a été lysé comme précédemment décrit dans le tampon de lyse TED (100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA et 5 mM DTT) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase à 1x et de lysozyme à 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Après l'étape de centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu et lavé trois fois dans le tampon de lavage 1 (TP1, 100 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 2 M urée et 2% Triton X-100) avec des étapes de centrifugation (4000 rpm 30 min) entre lavage. Une dernière étape de lavage avec le tampon de lavage 2 (TP2 = TP1 sans urée et triton) a été réalisée pour éliminer le Triton X-100 et l'urée. Cette méthode permet de purifier partiellement les protéines jusqu'à 90% de pureté ou plus. Les corps d'inclusions ainsi purifiés, ont été solubilisés dans du PBS 1x à une concentration élevée d'urée (8 M). Le mélange a été centrifugé (1 h à 4 000 rpm, 4°C) et filtré (filtre 0,22 μm) pour éliminer les débris cellulaires avant dialyse.

5.2.2.1.4 Dialyse de protéines

Pour éliminer la forte concentration d'urée et re-conformer partiellement les protéines insolubles purifiées de corps d'inclusions, la dialyse a été réalisée contre un premier tampon composé de PBS 1x, 2 M urée et 25 mM imidazole pour les protéines en fusion avec le tag 6xHis et un second tampon composé de PBS 1x, 2 M urée et 0,5 M EDTA pour les protéines avec le tag GST. Pour ce faire, les protéines purifiées des corps d'inclusions solubilisés et filtrés, ont été dialysées avec 1 volume de surnageant dans le boudin Spectra/Por® molecularporous membrane tubing (Spectrum Labs Inc, USA) contre 10 volume de tampon à 4°C. Après une première incubation sur une nuit, la dialyse s'est poursuivie à 4°C en changeant le tampon trois fois, chaque deux heures. À la fin, la solution dialysée a été concentrée contre du PEG-20 000 solide (Polyethylene glycol-20 000) et centrifugée pendant quelques secondes à 10 000 g et le surnageant contenant les fractions solubles et renaturées de protéines, a été récupéré et gardé à -20°C.

5.2.2.2 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

La technique de SDS-PAGE permet de séparer des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Cette électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été réalisée selon le protocole suivant : les échantillons, lysats totaux de cellules ou extraits protéiques particuliers préalablement extraits en sous-sous-section 5.2.3.1 et 5.2.3.2, ont été préparés en mélangeant 30 μL de chaque échantillon avec 10 μL de tampon de charge 4x (Tris-HCl 250 mM, SDS 8%, Glycérol 40%, 5 mg de bleu de bromophénol et β -mercaptoéthanol 1,43 M). Le SDS est un détergent anionique qui interrompt les liaisons hydrogènes entraînant la perte de la conformation tertiaire et secondaire de protéines. En recouvrant ces dernières, le SDS leur confère des charges négatives leur permettant de migrer du pôle négatif vers le pôle positif. Le β -mercaptoéthanol réduit des liaisons disulfures. Le mélange a été porté à ébullition à 100°C pendant 10 min. Puis 15 μL de chaque échantillon ont été chargés sur un gel préfabriqué Mini-PROTEAN TGX 4-20% (BioRad, Hercules, CA, USA) ou préparé manuellement composé d'un gel de concentration (4%) et d'un gel de séparation (10-15%). Le gel 4% permet de concentrer les protéines à l'entrée du gel de séparation comme sur une ligne de départ de course. Les protéines ont été séparées par l'application d'un courant de 200 V pendant 30 à 45 min dans le tampon de migration composé de Tris, Glycine et SDS, TGS 1X (Euromedex, France). Après la migration, le gel a été lavé à l'eau distillée et coloré avec l'InstantBlue™ (Abcam, Cambridge, UK) qui est une solution commerciale ou avec de bleu colloïdal (Bleu de Coomassie). Le gel a ensuite été imagé avec l'ImageQuant™ LAS 4000 (Cytiva, Washington, DC, USA) ou par un smartphone (Iphone 7, Samsung A10).

5.2.2.3 Préparation du bleu de Coomassie et coloration de protéines

La solution de coloration a été préparée en mélangeant 10 mL d'acide acétique glaciale avec 90 mL du mélange de méthanol : H₂O (1 :1 v/v) avec 0,25 g de Coomassie brillant blue R250 (Research Product International, B43000-25.0) dans un volume final de 100 mL. Pour colorer les protéines à la fin de l'électrophorèse, le gel a été submergé dans 10 à 15 mL de la solution de coloration dans une barquette et laisser incubé au moins 1 h à température ambiante à 50 rpm. Ensuite, le gel a été rincé 3

fois à l'eau distillée puis incubé dans un tampon de décoloration de même composition que la solution de coloration (sans bleu brillant). Le gel a été incubé dans ce tampon pendant 1 h puis rincer de nouveau à l'eau. La décoloration a été poursuivie sur toute une nuit dans l'eau distillée.

5.2.2.4 Quantification de protéines

Les protéines recombinantes et les lysats totaux de trypanosomes ont été dosés par la méthode colorimétrique, Pierce™ 660 nm Protein kit Assay (Thermo Fisher Scientific). Brièvement, une gamme de BSA (50 à 2 000 $\mu\text{g/mL}$) a été réalisée sur une plaque 96 puits et 10 μL de chaque échantillon ont été plaqués en triplicat. À ces dépôts, 150 μL de réactif de Pierce ont été ajoutés par puit. La plaque a été recouverte d'une feuille d'aluminium et mélange a été homogénéisé pendant 1 min à l'aide d'un support d'agitation, puis incubée pendant 5 min à température ambiante. La densité optique (DO 660 nm) a été mesurée avec le spectrophotomètre FluoStar Omega-BMG Labtech. La concentration de chaque échantillon a été estimée sur la courbe standard de la BSA (Bovine serum albumin) par extrapolation.

5.2.2.5 Enrichissement de sérums en immunoglobulines

Un volume de 550 μL d'un échantillon de sérum ou d'un pool de sérums (55V) a été mélangé avec 450 μL de sulfate d'ammonium $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100% (45V). Le mélange a été centrifugé à 14 600 rpm pendant 15 min. Le surnageant a été éliminé et le culot malaxé (lavage) dans 1 mL de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 40% et centrifugé à 14 600 rpm pendant 5 min puis le surnageant a été éliminé. Cette étape a été répétée deux fois de suite. Le culot obtenu a été resuspendu dans 220 μL d' H_2O distillée stérile. La préparation enrichie en immunoglobulines a ensuite été conservée à -80°C .

5.2.3 Techniques d'immuno-détection

5.2.3.1 Préparation des extraits protéiques totaux pour le western blot

Pour préparer des lysats totaux de trypanosomes pour le western blot, chacune des souches de trypanosomes a été amplifiée en culture dans une flasque de culture ventilée de 75 cm^2 pour Tb427 90.13 WT et de 150 cm^2 pour TcIL3000 WT dans leur milieu de culture respectif, à partir d'un inoculât de 5×10^3 parasites. À une certaine

densité cellulaire, les parasites ont été comptés et la culture a été centrifugée à 2000 rpm pendant 15 min. Le culot de cellules a été lavé plusieurs fois avec du PBS1x (centrifugation 8 000 g, 30-40 sec entre les lavages) et transféré dans un tube eppendorf de 1,5 mL. Le culot a ensuite été repris à $5 \times 10^6 / 10 \mu\text{L}$ dans une solution de SDS 2% contenant des inhibiteurs de protéases à 1x finale. Le mélange a été soniqué avec le sonicateur 200 μL selon le programme suivant : 2 cycles de 20 pulses pendant 30 sec. Le tampon de charge 4x du SDS-PAGE a été ajouté à 1x finale et le mélange a été bouilli à 100°C pendant 10 min avant d'être stocké à -20°C.

5.2.3.2 Préparation du sécrétome de *T. congolense* pour immunoblotting

Pour obtenir des extraits de sécrétome de *T. congolense*, nous avons récupéré 1×10^8 parasites qui ont été lavés deux fois avec du PBS 1x. Les parasites ont par la suite été incubés dans 4 mL de milieu de sécrétion (MEM sans sérum) sur une plaque 6 puits à 34°C, 5% de CO₂ pendant 16h. L'intégrité de cellules a été appréciée par l'observation au microscope (morphologie et motilité) et la numération de cellules intactes. Le rapport du nombre de cellules de départ/nombre de cellules intactes à la fin de l'incubation était estimé à 0,94 soit (94% de cellules intactes). Le surnageant contenant le sécrétome a été purifié des trypanosomes par centrifugation (1800 rpm, 10 min, 4°C) et filtré sur des filtres à protéines à faible liaison de 0,45 μm . Le sécrétome a été concentré à 200 μL final par centrifugation en utilisant un concentrateur (Thermo Scientific™ Concentrateur de protéines Pierce™ en PES, 2 à 6 mL, 88516S) à un seuil de rétention des molécules à 10 kDa selon les instructions du fournisseur. Le tampon de charge 4x SDS-PAGE a directement été ajouté aux échantillons et le mélange a été bouilli à 100°C pendant 10 min avant d'être déposé sur gel de polyacrylamide ou conservé à -20°C.

5.2.3.3 Western blotting

Pour réaliser le western blot, l'extrait de 5×10^6 parasites préalablement préparés (sous-sous-section 5.2.3.1) a été déposé sur gel de SDS-PAGE 4-20% (gels préfabriqués Mini-PROTEAN TGX, BioRad) et les protéines ont été séparées comme précédemment (sous-sous-section 5.2.2.2). Un marqueur de poids moléculaire (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, ThermoFischer Scientific, 26617) a été utilisé. Ensuite, les

protéines ont été transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (membrane PVDF Trans-Blot® Turbo™ Midi-size, BioRad) avec le système de transfert Trans-Blot® Turbo™ (BioRad). La membrane a été bloquée pendant 1 h à température ambiante avec du PBS contenant 0,1% de Tween-20 (PBST) et 5% de lait écrémé. Le tampon de blocage a été retiré et la membrane a été incubée pendant une nuit à 4°C avec les anticorps primaires (Tableau 5.5), soit un anticorps polyclonal anti-TbPLA-1b ou anti-TbGk produit par immunisation de lapins avec des protéines recombinantes, dilué respectivement à 1/1000 et 1/5000 dans le tampon de blocage. L'anti-PFR de lapin (anti-Paraflagellar Rod, dilué à 1/10 000) a été utilisé comme contrôle de charge. La membrane a été lavée trois fois pendant 10 min avec 5 ml de PBST, et incubée pendant 45 min à température ambiante avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (Tableau 5.5), dilué à 1/10 000 dans un tampon de blocage. La membrane a été lavée comme précédemment et la réaction révélée par chimioluminescence à l'aide du substrat de Western Blotting Pierce™ ECL (Thermo Fisher Scientific). Les images ont été acquises avec l'ImageQuant™ LAS 4000.

5.2.3.4 Immunoblotting sur bandelettes

Les expériences d'immunoblotting ont été réalisées sur le sécrétome de TcIL3000 selon les mêmes étapes que le western blot. Pour ce faire, un gel SDS-PAGE de 10% avec 2 puits, un puit de 0,3-0,4 cm pour le marqueur et un second puit plus grand de 6-7 cm de long, a été préparé. Environ 250 µL d'une préparation de sécrétome ont été migrés dans ce gel et les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF. La membrane a été coupée en plusieurs bandelettes de même taille, qui ont été incubées séparément sur un plateau de western blot et bloquées avec du PBST-lait écrémé 5% (2 heures à température ambiante). Chaque échantillon de sérums (Tableau 5.4 immunoblotting) a été dilué au 1/200 dans le tampon de blocage et incubé avec une bandelette pendant 1 h à température ambiante avec agitation. La bandelette a été lavée quatre fois au PBS 0,1% de Tween-20 et incubée avec un conjugué anti-bovine dilué au 1/10 000 pendant 1 h à température ambiante et avec agitation. La bandelette a été relavée quatre fois. La réaction immunologique a été révélée comme précédemment et les images ont été acquises au LAS 4000.

5.2.3.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

La technique de détection d'anticorps ELISA a été utilisée pour évaluer l'antigénicité des protéines recombinantes et donc leur potentiel diagnostique. Le protocole a été optimisé pour chaque antigène afin de déterminer le tampon et la concentration de coating optimal de l'antigène et la concentration de l'anticorps secondaire (conjugué). Des plaques de 96 puits Nunc Immuno F96 Polysorb (Thermo Fisher Scientific) ont été enduites avec 0,5 μg d'antigène par puits dans un tampon bicarbonate 100 mM pH 9,6 à 4°C pendant une nuit (100 μL /puits). Le jour suivant, chaque puit a été bloqué avec du PBS-Tween-20 0,1% (PBST) avec 5% de lait écrémé (Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche, France) pendant 1 h à 37°C (150 μL /puits). Le tampon de blocage a été retiré, chaque échantillon de sérum dilué au 1/100 dans le tampon de blocage a été ajouté dans les puits en double (100 μL /puits) et incubé pendant 1 h à 37°C. Les plaques ont ensuite été lavées 3 fois 5 min avec du PBST, et incubées pendant 1 h à 37°C avec 100 μL /puits d'un anticorps secondaire dilué dans du tampon de blocage (Tableau 5.5). L'anticorps IgG anti-bovin de mouton conjugué à de la peroxydase de raifort (réf. AAI23P, BioRad) dilué au 1/10 000 a été utilisé pour les sérums de bovins. Après une étape de lavage comme ci-dessus, 100 μL /puits de substrat Enhanced K-Blue® (Neogen, Lansing, MI, USA) ont été ajoutés et les plaques ont été incubées pendant au moins 15 min dans l'obscurité. La DO a été mesurée à 620 nm dans un lecteur ELISA.

5.2.4 Spectrométrie de masse

L'identification de protéines par la spectrométrie de masse a été réalisée à la Plateforme Proteome de l'Université de Bordeaux par Jean-William Dupuy (protocole expérimental en annexe 4 [page 186](#)).

5.2.5 Statistiques et analyse des données

5.2.5.1 Représentations graphiques

Toutes les représentations graphiques ont été établies en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 5 (San Diego, CA, USA), le logiciel R (version R 4.0.3 GUI 1.73 Catalina build (7892)) et le logiciel Excel version 2011.

5.2.5.2 Traitements de données et analyses statistiques

5.2.5.2.1 Évaluation du potentiel diagnostique de protéines recombinantes

Pour les résultats d'ELISA, nous avons calculé la moyenne des valeurs de DO (duplicats) de chaque échantillon, nous en avons soustrait la valeur de DO du contrôle conjugué (anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort) et les données ont été exprimées en pourcentage relatif de positivité : $RPP = (DO \text{ de l'échantillon} / DO \text{ du témoin positif}) \times 100$, pour normaliser la réactivité de l'antigène. Pour réaliser des analyses statistiques notamment descriptives, nous avons vérifié la normalité de données par le test de Shapiro-Wilk sur le logiciel R. La distribution des données ne suivant pas une loi normale (loi de Gauss), nous avons utilisé le test non paramétrique univarié de Man Whitney (comparaison de somme de rangs) pour comparer la réactivité des sérums positifs avec celle des sérums négatifs en considérant un seuil de significativité fixé à 0,05.

Par ailleurs, une analyse ROC (Receiver Operating Characteristic) a été réalisée à l'aide du logiciel Prism Graph Pad pour déterminer les paramètres de performance diagnostique au seuil optimal (cut-off) de chaque antigène, séparant les lots de sérums positifs des sérums négatifs. Ces paramètres comprennent l'aire sous la courbe (AUC), la sensibilité (se), la spécificité (sp) et leur intervalle de confiance (IC) à 95%, et enfin le rapport de vraisemblance (LR). La valeur seuil (cut-off) pour chaque panel de sérum a été déterminée en utilisant la méthode décrite par Johnson (2004) (Johnson, 2004), basée sur le rapport de vraisemblance plus proche de la méthode de la distance verticale maximale (Habibzadeh et al., 2016). Les échantillons dont les valeurs de RPP étaient supérieures à la valeur seuil ont été classés positifs par le test et les échantillons dont les valeurs de RPP étaient inférieures à la valeur seuil ont été classés négatifs.

5.2.5.2.2 Réponses anticorps de bovins au sécrétome de *T. congolense*

Pour l'analyse de la réactivité des sérums des bovins trypanotolérants et trypanosusceptibles (ou trypanosensibles) infectées avec *T. congolense* IL1180, nous avons traité les immunoblots par Image J et quantifié l'intensité de chaque bande sur chaque bandelette à un temps d'exposition de 30 sec pour toutes les bandelettes. Les niveaux de gris ainsi déterminés ont été représentés en carte thermique (heatmap) en utili-

sant la fonction `heatmap.2` du package `ggplot` de R, pour mieux comparer les profils de différentes races bovines. Sur les mêmes valeurs d'intensité, nous avons réalisé une analyse en composantes principales (ACP) en considérant les différentes bandes détectées comme variables et les différents échantillons comme individus. L'ACP permet d'extraire et de visualiser les informations importantes contenues dans une table de données à plusieurs variables. Elle synthétise la table multivariée en composantes principales (2 ou 3) qui permettent de définir les directions le long desquelles la variation des données est maximale. Cette ACP a été réalisé sur R sur des valeurs brutes (non réduites) et a permis d'identifier la redondance et la variabilité entre échantillons de différentes dates, entre individus et entre races bovines.

5.2.6 Outils bioinformatiques

Plusieurs programmes bioinformatiques et bases de données ont été utilisées au cours de cette thèse. Pour toutes les études confondues menées, nous avons utilisé les bases de données suivantes : (a) TriTrypDB database (<https://tritrypdb.org>), pour récupérer des séquences protéiques ou toutes les données du génome d'une souche de trypanosomes ; (b) la base de données Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) pour récupérer les séquences de protéines de bovins ou de la bactérie *Anaplasma* et enfin (c) la base de données *PiroplasmaDB* (<https://piroplasmadb.org/piro/app>) pour récupérer les séquences protéiques de *Babesia* et *Theileria*.

Pour une protéine donnée, nous avons réalisé des BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dans un premier temps pour identifier toutes protéines orthologues chez les trypanosomes, chez les bovins, chez *Piroplasma spp.* et *Anaplasma*. Par la suite nous avons utilisé le programme Clustal Omega de EMBL-EBI (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) pour aligner deux à deux les séquences protéiques et déterminer le degré l'homologie entre séquences protéiques. Le logiciel Geneious V4.8 a également été utilisé pour comparer les séquences protéiques et déterminer leur similarité.

Sur la majorité des protéines étudiées, évaluées en diagnostic ou encore identifiées par l'analyse protéomique, nous avons recherché de potentiels peptides immunogéniques en utilisant un outil de prédiction d'épitopes linéaires de cellules B. L'algo-

rithme utilisé est le Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 disponible à partir de la base de données de l'IEDB (<http://tools.iedb.org/bcell/>). Les séquences peptidiques ayant une taille comprise entre 5 et 30 acides aminés ont été considérés.

La classification des protéines identifiées par l'analyse de masse (LC-MS/MS) a été réalisée par l'enrichissement GO (Gene Ontology) qui catégorise les protéines en fonction des processus biologiques, des composants cellulaires et des fonctions moléculaires qui leur sont associés. Pour réaliser cette analyse, nous avons effectué une recherche de GO connus ou putative (computed) sur la base de données TriTrypDB selon la stratégie suivante : (i) Recherche des gènes avec les ID fournis par l'analyse protéomique ; (ii) au niveau des résultats, un choix de la catégorie GO a été effectué et la recherche des protéines qui y appartiennent, a été effectuée ; (iii) Les différentes classes ont été déterminées en définissant un seuil de 0,05, qui est la probabilité qu'un certain terme GO apparaisse parmi les gènes recherchés plus souvent qu'il n'apparaît dans l'ensemble des gènes de l'organisme en présence.

6 | **Nouvelles protéines candidates pour le sérodiagnostic de la trypanosomose animale africaine : Évaluation du potentiel diagnostique de la lysophospholipase et de la glycérol kinase de *Trypanosoma brucei***

Toukara M^{1,4,5}, Boulangé A^{2, 3, 4}, Bringaud F¹, Thonnus M¹, Bélem AMG⁶, Bengaly Z⁵, Thévenon S^{2, 3}, Berthier D^{2, 3}, Rivière L^{1*}.

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

2 CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France

3 INTERTRYP, Univ Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France

4 CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

5 Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

6 Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

*loic.riviere@u-bordeaux.fr

6.1 Résumé

La trypanosomose animale africaine transmise par les glossines est une maladie endémique en Afrique subsaharienne qui entrave le développement de l'élevage sur le continent. À l'inverse de la maladie du sommeil qui n'existe qu'en foyers localisés de nos jours, elle touche des zones plus étendues. Le contrôle de la maladie repose sur la chimiothérapie, la lutte anti-vectorielle et bien évidemment le diagnostic. Tous ces outils de lutte et de contrôle, qui sont d'ordinaire efficaces lorsqu'ils sont combinés, rencontrent parfois des défaillances lorsque certaines règles ne sont pas respectées. Les mauvais usages, tout comme l'emploi continu/régulier d'un nombre limité de molécules anti-trypanosomiennes, sont responsables de l'apparition de souches de trypanosomes de plus en plus résistantes aux médicaments. Quoique élément décisionnel

de la lutte, aucun diagnostic des trypanosomoses animales africaines ne répond aux critères REASSURED. En termes de diagnostic sérologique, le plus performant actuellement, l'ELISA indirect contre les antigènes totaux, souffre d'un manque de standardisation des réactifs.

Pour pallier les déficiences des tests sérologiques, plusieurs protéines recombinantes ont été évaluées comme cibles antigéniques. Cependant, mêmes les plus prometteurs des candidats échouent à cause d'une sensibilité faible lorsque les animaux sont en primo-infection ou dans le cas d'une infection chronique. En partant de ce constat et sachant que le « graal » du diagnostic est basé sur les antigènes totaux dont la production est éthiquement discutable, il semble évident que le diagnostic sérologique doit être réinventé.

Dans cette étude, qui a constitué la première activité de cette thèse, nous avons évalué le potentiel diagnostique de deux protéines de *T.b brucei* (TbLysoPLA et TbGK) en ELISA indirect de détection d'anticorps. Deux banques de sérums du CIRDES ont été utilisées : des sérums issus d'infection expérimentale et des sérums de terrain. Pour fournir une preuve du concept selon lequel l'association judicieuse de protéines immunoréactives permettrait d'améliorer la sensibilité et la spécificité des tests basés sur les antigènes recombinants, nous avons utilisé ces molécules seules puis en combinaison entre elles, associées ou pas avec la protéine BiP de *T. congolense*, son domaine C-terminal tronqué de la partie N-terminale.

Les protéines (TbLysoPLA et TbGk) n'ont jamais été testées auparavant en diagnostic de la TAA. Nous les avons sélectionnées pour tester leur potentiel diagnostique sur la base de leurs propriétés intrinsèques, immunogénicité pour TbLysoPLA, abondance pour TbGK. Ces protéines ont d'abord été caractérisées *in silico*. L'analyse comparative de leurs séquences avec celles de leurs homologues et orthologues a montré que les deux protéines étaient bien conservées chez les trypanosomes : homologie >60% pour TbLysoPLA et >80% pour TbGK. Alors que des épitopes ont été prédits sur leurs séquences, TbGK partageait néanmoins jusqu'à 58% d'homologie avec son orthologue chez les bovins. Après leur expression et purification, l'évaluation en diagnostic sérologique a montré que les deux protéines utilisées séparément avaient une faible performance diagnostique. Cependant, utilisées conjointement avec la protéine

BiP, elles ont montré une sensibilité de 60% et une spécificité comprise entre 87 et 96%, comparables aux tests ELISA de référence. En conclusion, nous avons montré que les performances des combinaisons de protéines sont bien meilleures que celles des protéines testées individuellement pour le diagnostic de la TAA.

Les résultats de cette activité ont été valorisés dans un article scientifique qui sera soumis prochainement pour publication dans la revue *PLOS Neglected Tropical Diseases*.

6.2 Article

Magamba Tounkara, Alain Boulangé, Frédéric Bringaud, Magali Thonnus, Adrien Marie-Gaston Belem, Zakaria Bengaly, Sophie Thévenon, David Berthier and Loïc Rivière. Novel protein candidates for serodiagnosis of African animal trypanosomosis : Evaluation of the diagnostic potential of lyophospholipase and glycerol kinase from *Trypanosoma brucei*. *In preparation*.

1 **Novel protein candidates for serodiagnosis of African animal**
 2 **trypanosomosis: Evaluation of the diagnostic potential of**
 3 **lysophospholipase and glycerol kinase from *Trypanosoma brucei***

4 **Toukara M**^{1,4,5}, Boulangé A^{2, 3, 4}, Thonnus M¹, Bringaud F¹, Bélem AMG⁶, Bengaly Z⁵,
 5 Thévenon S^{2,3}, Berthier D^{2,3}, Rivière L^{1*}.

6 ¹ Univ. Bordeaux, CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234,
 7 F-33000 Bordeaux, France

8 ² CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France.

9 ³ INTERTRYP, Univ Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France

10 ⁴ CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

11 ⁵ Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
 12 (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

13 ⁶ Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

14 **Authors email address**

15 –***Corresponding author** : Loïc RIVIÈRE ; Université de Bordeaux, UMR 5234 CNRS-
 16 MFP, 146 rue Leo Saignat - Bâtiment 3A 1er étage, 33076 Bordeaux Cedex – France ;
 17 Mail : loic.riviere@u-bordeaux.fr; T. +33 5 57 57 48 39

18 –Alain Boulange alain.boulange@cirad.fr ; Frédéric Bringaud frederic.bringaud@u-bordeaux.fr ;
 19 Magali Thonnus magali.thonnus@u-bordeaux.fr ; Adrien Marie Gaston
 20 Belem belemamg@hotmail.fr ; Zakaria Bengaly zbengaly1@gmail.com ; Sophie
 21 THEVENON Sophie.THEVENON@cirad.fr ; David Berthier david.berthier@cirad.fr ;
 22 Loïc Rivière loic.riviere@u-bordeaux.fr.

23 **Key words:** African Animal Trypanosomosis, serodiagnosis, phospholipase and
 24 glycerol kinase.

25 **Abstract**

26 African trypanosomosis, a parasitic disease caused by protozoan parasites
 27 transmitted by tsetse flies, affects both humans and animals in sub-Saharan Africa.
 28 While the human form (HAT) is now limited to foci, the animal form (AAT) is widespread
 29 and affects the majority of sub-Saharan African countries, and constitutes a real
 30 obstacle to the development of animal breeding. The control of AAT is hampered by a
 31 lack of standardized and easy-to used diagnosis tools. This study aimed to evaluate
 32 the diagnostic potential of TbLysoPLA and TbGK proteins from *Trypanosoma brucei*
 33 *brucei* for AAT serodiagnosis in indirect ELISA using experimental and field sera,
 34 individually, in combination, and associated with the BiP C-terminal domain (C25) from
 35 *T. congolense*. These novel proteins were characterized *in silico*, and their sequence
 36 analysis showed strong similarities with their orthologs in trypanosomes (more than

37 60% for TbLysoPLA and more than 82% for TbGK). TbLysoPLA displays a low
38 homology with cattle (<35%) and *Piroplasma* (<15%). However, TbGK shares more
39 than 58% with cattle and between 45-55% with *Piroplasma*. We could identify seven
40 predicted epitopes on TbLysoPLA sequence and 14 potential epitopes on TbGK. Both
41 proteins were recombinantly expressed in *Escherichia coli*. Their diagnostic potential
42 was evaluated by ELISA with sera from cattle experimentally infected with *T.*
43 *congolense* and with *T.b. brucei*, sera from cattle naturally infected with *T. congolense*,
44 *T. vivax* and *T.b. brucei*. Both proteins used separately had poor diagnostic
45 performance. However, used together with the BiP protein, they showed 60% of
46 sensitivity and between 87-96% of specificity, comparable to reference ELISA tests. In
47 conclusion, we showed that the performance of the protein combinations is much
48 better than the proteins tested individually for the diagnosis of AAT.

49 Introduction

50 African animal trypanosomoses (AAT) or nagana are hemoparasitic infections
51 caused mainly by *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei brucei* that are
52 transmitted mostly by tsetse flies. Nagana is a devastating livestock disease that
53 affects 38 African countries in the sub-Saharan region. Nearly 55 million cattle are at
54 risk over an area of 10 million km² where the tsetse fly is endemic [1]. The clinical
55 manifestations of the disease are diverse and non-pathognomonic. Observed
56 symptoms include weight loss, sterility, abortion, and in some acute cases the rapid
57 death of the animal. The major pathological feature is anemia [2]. This disease leads
58 to a general deterioration of the animal conditions that diminishes its physical
59 performance and ability to produce milk and meat, thus causing both economic and
60 nutritional difficulties for the growing African population. According to the FAO (2020)
61 [3], nearly three million cattle die from AAT, and the overall economic losses are
62 estimated at US\$4.75 billion per year. Due to the ability of trypanosomes to regularly
63 change their glycoprotein coat, no conventional vaccine could be developed against
64 AAT [4]. Therefore, the control of the disease is based on three pillars, vector control,
65 chemotherapy and diagnosis. The continuous and often improper use of the same
66 trypanocides since the 1960s, estimated by the FAO at 35 million doses per year in
67 sub-Saharan Africa [3], is responsible for the emergence of drug resistances [5]. In this
68 context, the detection of trypanosome infection becomes an essential step in

69 chemotherapy. It is based on either of two principles: the detection of the parasite itself
70 or its constituents, DNA or proteins, or the detection of the host immune response
71 directed against the parasite, chiefly antibodies. Depending on the target, different
72 methods can be used. Parasitological diagnosis based on microscopy is comparatively
73 easy to perform but lack sensitivity. Molecular diagnosis (PCR and LAMP) is both very
74 sensitive and specific, but requires relatively sophisticated facilities [6].
75 Immunodiagnosis is the only one adapted for use in field conditions, particularly under
76 RDT (Rapid Diagnostic Test) format. However, there is as yet no antigen capture test
77 available, that would allow detecting active infections. The antibody detection tests in
78 ELISA format currently in use are limited by the use of whole trypanosome lysates as
79 antigen [7], stumbling upon the problem of antigen standardization. The few tests that
80 were developed making use of a unique recombinant protein as antigen to bypass
81 standardization issues consistently lacked sensitivity. There is therefore a need for
82 novel antigen candidates to increase the specificity and sensitivity of antibody-
83 detection tests based upon recombinant proteins. Here we evaluated two proteins, the
84 *T.b. brucei* lysophospholipase (TbLysoPLA) and the glycerol kinase (TbGK) for their
85 potential in antibody-ELISA (Ab-ELISA). They were tested individually, in combination
86 with each other, and associated with a known immunodominant *T. congolense* antigen,
87 the C-terminal part of the Immunoglobulin Binding Protein (BiP), called C-25. These
88 proteins, initially selected from the literature for their immunogenicity, were
89 characterized *in silico*, recombinantly expressed and evaluated for their diagnostic
90 potential. Proteins mixtures showed a better diagnostic accuracy when compared to
91 individual proteins in indirect ELISA. This result constitutes the first report of the
92 superior performance of protein combinations in AAT diagnosis. It provides the
93 opportunity to explore innovative approaches through the association of immunogenic
94 peptides from immunoreactive proteins.

95 **Materials and Methods**

96 **Comparative sequence analysis and immuno-informatics**

97 For each protein candidate, sequences were retrieved from the TriTrypDB
98 database (<https://tritrypdb.org>). Orthologous sequences in other trypanosomes were
99 obtained by performing a BLASTP search in the same database. Sequences in cattle,
100 *Piroplasma spp* and *Anaplasma* were retrieved by a BLASTP search on Uniprot

101 (<https://www.uniprot.org/>). The sequences were then aligned in pairs using Geneious
102 v4.8 software (demo version) to determine their level of homology. Protein antigenicity
103 was predicted using the Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 algorithm from the
104 IEDB database (<http://tools.iedb.org/bcell/>).

105 **Total parasites lysates, TcoCB1 and C25 antigens for ELISA**

106 The total lysates (of *T.b. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax*) used as reference
107 antigens in ELISA tests as recommended by the OIE
108 ([https://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-
109 online/](https://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/)) were provided by CIRDES. Antigens were prepared as follows. Briefly,
110 parasites were grown *in vivo* in rats, the blood collected at peak parasitemia, and
111 parasites separated from the blood components by anion exchange chromatography
112 on DEAE cellulose [8]. The purified trypanosomes were then lysed by three
113 freeze/thaw cycles and sonicated in phosphate-saline-glucose buffer. Soluble antigens
114 for ELISA were separated from the particulate elements by centrifugation. The
115 recombinant cathepsin B-Like protease 1 (TcoCB1) antigen had been previously
116 characterized and tested for its diagnostic potential [9]. It was recently included in a
117 RDT device [10]. The purified TcoCB1 was provided by the UMR-5234-MFP laboratory
118 (Bordeaux, France). We used this antigen as a control in our study. The C25 is a
119 truncation of the Immunoglobulin Binding Protein (BiP) of *T. congolense*. It had been
120 cloned previously in the pMal-CRI plasmid in frame with the maltose binding protein
121 (MBP)-tag [11]. The recombinant plasmid was used to transform *Escherichia coli* BL21
122 Star™ (DE3) strain (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States). C25 was expressed and
123 purified on amylose resin according to the manufacturer's instructions (Amylose Resin,
124 NEB, UK).

125 **Cloning of TbLysoPLA and TbGK genes**

126 The TbLysoPLA gene had been previously cloned in *T.b. brucei* phospholipases
127 study context (Monic & al, manuscript in revision). Briefly, the TbLysoPLA open reading
128 frame (ORF) (Tb427.08.6390) was amplified by PCR from *T.b. brucei* 427 genomic
129 DNA using specific primers: aS (TbLysoPLA-pGEX-Fw): 5'-
130 AGCTCGAGATGTTTGGCACGCCGTTGAGAAT-3'; aAS (TbLysoPLA-pGEX-Rv): 5'-
131 AGGCGGCCGCTTACGATTTTCGATGAAGGTCCGG-3'. The 861 bp product was
132 cloned using the restriction enzymes Xho1 and Not1 (sites underlined in the primer
133 sequences) into the plasmid pGEX-4T-1 (GE Healthcare 28-9545-49) in frame with the

134 GST (Glutathione- S-Transferase) after the thrombin cleavage site. The TbGK ORF
135 had been previously cloned in the pET151 plasmid at the University of Tokyo [12], and
136 was provided by the UMR-5234-MFP laboratory. The recombinant vectors have been
137 used to transform *Escherichia coli* BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA,
138 United States) and JM109 (DE3) (Promega, Fitchburg, WI, United States) strains for
139 TbLysoPLA and TbGK expression respectively.

140 **Expression and purification of TbLysoPLA and TbGK**

141 The bacteria transformed with the recombinant vectors were cultured at 37°C up
142 to an Optical Density (OD) at 600 nm between 0.6 and 0.8. Protein expression was
143 then induced by the addition of isopropylthio-β-D-galactoside (IPTG) to a final
144 concentration of 1 mM. Protein production was continued for 3h at 37°C under 200
145 rpm agitation. Bacteria were then harvested by centrifugation at 4000 x g for 10 min,
146 and the pellets stored at -20°C. For the TbLysoPLA protein purification the protocol
147 was the same as described elsewhere (Monic & al, manuscript in revision). Pellets
148 were suspended in PBS containing 100 µg/L lysozyme, the suspension incubated at
149 30°C for 30 min under 200 rpm agitation, and the bacteria then lysed on ice in a
150 sonicator (four cycles of 20 pulses for 30 s). The lysate was clarified by centrifugation
151 at 10,000 x g for 30 min at 4°C. The supernatant was loaded onto a glutathione
152 Sepharose 4B resin column (GE Healthcare, Chicago, IL, United States) previously
153 equilibrated with PBS that was placed on a rotator at 6 rpm overnight at room
154 temperature (RT). The column was then washed with ten times volume of PBS using
155 gravity only. Five units of thrombin protease were added to the column, which was put
156 back on the rotator overnight at 30 rpm at RT. The slurry was left to sediment, and
157 fractions containing the cleaved TbLysoPLA protein collected by gravity and stored at
158 4°C with 1x protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland). As regards the
159 TbGK protein, it was purified by affinity chromatography on the HisPur™ Ni-NTA nickel
160 resin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's
161 instructions. Protein concentrations were determined using the Pierce™ 660nm
162 Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Purified recombinant proteins were
163 lyophilized to be transferred to CIRDES (Burkina Faso). All steps were verified by
164 polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).

165 SDS-PAGE

166 Polyacrylamide gel electrophoresis was done according to the following protocol.
167 The samples were prepared by mixing 30 μ L of each sample with 10 μ L of 4x loading
168 buffer (Tris-HCl 250 mM, SDS 8%, Glycerol 40%, 5 mg of bromophenol blue and β -
169 mercaptoethanol 1.43 M). The mixture was boiled at 100°C for 10 min. Then 15 μ L of
170 each sample were loaded on Mini-PROTEAN TGX 4-20% precast gels (Bio-Rad,
171 Hercules, CA, USA). The proteins were separated at 200 V for 30-45 min in Tris-
172 Glycine-SDS buffer (TGS) 1X. After migration, the gel was washed with distilled water
173 and stained with InstantBlue™ (Abcam, Cambridge, UK). The gel was then imaged
174 with ImageQuant™ LAS 4000 (Cytiva, Washington, DC, USA).

175 Western blotting

176 Total trypanosome extracts of *T.b. brucei* Tb427 strain and *T. congolense* IL3000
177 strain were prepared for western blotting by sonicating 5×10^6 cells twice 30 s in 10 μ L
178 SDS 2% with proteases inhibitor cocktail 1x. The suspension was mixed with 2x
179 loading buffer and boiled for 10 min. TbLysoPLA *T.b. brucei* gene knockout strain
180 (KOTbLysoPLA) extract and total *T.b. brucei* extract with RNAi silenced TbGK
181 expression provided by the UMR-5234-MFP laboratory were also prepared. After
182 separation on a 4-20% SDS-PAGE gel (Mini-PROTEAN TGX precast gels, Bio-Rad),
183 the proteins were transferred to a polyvinylidene fluoride membrane (Trans-Blot®
184 Turbo™ Midi-size PVDF membrane, Bio-Rad) with the Trans-Blot® Turbo™ Transfer
185 System (Bio-Rad). The membrane was blocked for 1h at RT with PBS containing 0.1%
186 Tween-20 (PBST) and 5% skimmed milk. The blocking buffer was removed and the
187 membrane incubated overnight at 4°C with the primary antibody, either a polyclonal
188 anti-TbLysoPLA or anti-TbGK produced by immunization of rabbits with recombinant
189 proteins, diluted respectively at 1:1000 and 1:5000 in blocking buffer. The rabbit anti-
190 PFR (anti-Paraflagellar Rod protein, diluted 1:10 000) was used as loading control.
191 The membrane was washed three times 10 min with 5 mL PBST, and incubated 45
192 min at RT with a secondary peroxidase-conjugated antibody diluted 1:10 000 in
193 blocking buffer. The membrane was washed as before and the reaction revealed by
194 chemiluminescence using Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher
195 Scientific). Images were acquired with the ImageQuant™ LAS 4000.

196 Origin of the sera used in the study

197 Two collections of sera were provided by CIRDES. One came from an
198 experimental infection conducted in 2014 by GALVmed (Global Alliance for Livestock
199 Veterinary Medicine) to study the efficacy of novel trypanocides. Animals had been
200 experimentally infected with strains of *T. congolense* and *T. vivax* isolated in different
201 West African countries. We tested 100 serum samples taken before infection and 100
202 taken post-infection but before treatment with trypanocides, on *T. congolense* indirect
203 ELISA, of which 37 *T. congolense*-infected cattle samples and 31 non-infected cattle
204 samples were used. The second CIRDES collection were field sera collected during
205 the AAT-2019 mission, aimed at surveying the epidemiology of AAT in some localities
206 in south-west Burkina Faso (manuscript in preparation). ELISA and PCR data were
207 available and served as a basis to select 37 positive sera from cattle with single and
208 mixed infection with *T.b. brucei*, *T. congolense* and/or *T. vivax*, and 31 negative sera.
209 In addition, CIRDES provided four sera from non-infected cattle, ten from *T.b. brucei*-
210 infected cattle.

211 Antibody detection by ELISA: Ab-ELISA

212 The ELISA antibody detection technique was used to evaluate the antigenicity of
213 recombinant proteins. The protocol was optimized for each antigen to determine the
214 optimal coating buffer, antigen coating concentration, and secondary antibody
215 (conjugate) concentration. Nunc Immuno F96 Polysorb 96-well plates (Thermo Fisher
216 Scientific) were coated with 0.5 µg of antigen per well in 100 mM bicarbonate buffer
217 pH 9.6 at 4°C overnight (100 µL/well). The day after, each well was blocked with PBS-
218 Tween-20 0.1% (PBST) with 5% skimmed milk (Régilait, Saint-Martin-Belle-Roche,
219 France) for 1h at 37°C (150 µL/well). The blocking buffer was removed, each serum
220 samples diluted 1:100 in blocking buffer added in duplicate wells (100 µL/well) and
221 incubated for 1h at 37°C. Plates were then washed 3 times 5 min with PBST, and
222 incubated for 1h at 37°C with 100 µL/well of a secondary antibody diluted in blocking
223 buffer. Horseradish peroxidase-conjugated sheep anti-bovine IgG (ref. AAI23P, Bio-
224 Rad) diluted 1:10 000 was used. After a washing step as above, 100 µL/well of
225 Enhanced K-Blue® Substrate (Neogen, Lansing, MI, USA) was added and the plates
226 were incubated for at least 15 min in the dark. The OD was measured at 620 nm in an
227 ELISA reader.

228 **Statistics and results analysis**

229 Image J, Excel version 2011, GraphPad Prism version 5, and R software were
230 used to analyze and process the results. For ELISA, the duplicate OD values of each
231 sample were averaged, the horseradish peroxidase-conjugated antibody OD value
232 subtracted from it, and expressed as relative percent of positivity $RPP = (\text{sample OD}/\text{positive control OD}) \times 100$ to normalize antigen reactivity. The non-parametric
233 Mann-Whitney test was used to assess the significance of the difference of RPP
234 between infected and non-infected cattle sera for the experimental sera, and positive
235 versus negative sera samples for field sera. In addition, Receiver Operating
236 Characteristic (ROC) analysis was conducted using GraphPad Prism software to
237 determine the diagnostic performance parameters for each antigen at the optimal cut-
238 off value. These parameters include the area under the curve (AUC), the sensitivity
239 (Se), the specificity (Sp) and their 95% confidence interval (CI), and finally the
240 likelihood ratio (LR). The cut-off value for each serum panel was determined using the
241 method described by Johnson (2004) [13] based on the likelihood ratio closer to the
242 maximum vertical distance method [14]. Samples with RPP values above the cut-off
243 were categorized positive for the test and samples with RPP values below the cut-off
244 were categorized negative.
245

246 **Results**

247 **Identification of proteins as potential candidates for diagnosis**

248 *LysoPhospholipase of T.b. brucei is a secreted/excreted and an immunogenic protein*

249 Phospholipases are among the enzymes involved in host erythrocytes lysis
250 during trypanosomes infection. They are involved in lipids catabolism and may
251 constitute virulence and pathogenicity factors by affecting cell membrane lipids [15].
252 Trypanosomes possess several phospholipases. It has been shown that *T.b. brucei*
253 lysophospholipase (TbLysoPLA) is a secreted/excreted protein, and that it induces the
254 production of specific antibodies in mice infected with this parasite (Monic *et al.*,
255 manuscript in revision). It was because of this strong immunogenicity that TbLysoPLA
256 was deemed suitable as a candidate for serological diagnosis, hence our choice for its
257 evaluation in AAT diagnosis.

258 *The abundance of T.b. brucei glycerol kinase*

259 The glycerol kinase of trypanosomes is one of the glycolytic enzymes. These
260 enzymes are very abundant proteins that represent up to 4% of the trypanosome
261 proteome [16] and play very critical functions in the cell. Several glycolytic enzymes
262 have been targeted as antigens for the detection of various parasites. For instance,
263 the fructose-1,6-biphosphate aldolase (FBPA) has been used for malaria [17] and
264 schistosomiasis [18] immunodiagnostic. More recently, aldolase [19] and pyruvate
265 kinase [20] have been targeted for the detection of *T. congolense* using specific
266 antibodies from camelids. Glycerol kinase from *T.b. brucei* has been proposed as a
267 therapeutic target [12]. In addition, preliminary studies in the laboratory had shown that
268 specific antibodies directed against this protein are detected in *T.b. brucei*
269 experimentally infected mice sera. This immunogenic property coupled with its intrinsic
270 abundance guided our choice to evaluate TbGK as a diagnostic target.

271 *Proteins sequences analysis and prediction of antigenicity*

272 To assess a possible cross-reaction with other blood pathogens such as
273 *Piroplasma* parasites or *Anaplasma spp.* and predict the antigenicity of both
274 TbLysoPLA and TbGK, sequence alignments and B-cell epitope predictions were
275 conducted. The sequences analysis also allowed to evaluate the likelihood of cross
276 reactivity between trypanosome species and with *Leishmania*. Each protein was
277 compared to its orthologs (in *T. congolense* and *T. vivax*) and the relative percentage
278 of homology was determined by pairwise alignment of the amino acid sequences. The
279 results show that phospholipase TbLysoPLA is conserved in trypanosomes group with
280 more than 61% homology, displaying the most similarity with its ortholog in *T.*
281 *congolense* with 71.9% homology. The three orthologs share about 53% homology
282 with *Leishmania infantum* but show a weak similarity with those in cattle (<35%) and
283 *Piroplasma* parasites (similarity <15%) (Table 1). TbGK is much more conserved in
284 trypanosomes (homology $\geq 82\%$). The trypanosomes glycerol kinases share a high
285 similarity (about 60% homology) with bovine and *L. infantum* orthologs but also with
286 those of *Babesia bovis* ($\geq 45\%$) and *Theileria parva* ($\sim 55\%$ with *T.b. brucei*, $\leq 39\%$ with
287 *T. congolense* and *T. vivax*) (Table 1). The prediction of epitopes for TbLysoPLA and
288 TbGK reveals presence of seven linear epitopes on the TbLysoPLA sequence spread
289 over the entire sequence and ranging in size from 6 to 27 amino acids (aa) and scoring
290 between 0.529 to 0.619. Five of those epitopes are conserved in *T. congolense*
291 ortholog protein. The TbGK protein shows more linear epitopes (14 in total) of varying

292 size from 5 to 48 aa with scores ranging from 0.469 to 0.537 (Table 2) and all are
293 conserved in both *T. congolense* and *T. vivax*.

294 **Specific anti-TbLysoPLA and anti-TbGK antibodies react respectively with** 295 **TbLysoPLA and TbGK orthologs in *T. congolense***

296 Comparative analysis of TbLysoPLA and TbGK sequences showed a relatively
297 good conservation within the *Trypanosoma* genus. It may thus be possible to use these
298 proteins to detect trypanosomal infections across the species spectrum. To confirm
299 this hypothesis, we used specific anti-TbLysoPLA and anti-TbGK antibodies on
300 western blot of total extract of *T.b. brucei* and *T. congolense* wild-type (WT), on extract
301 of TbLysoPLA *T.b. brucei* gene knockout strain (KOTbLysoPLA), and on total *T.b.*
302 *brucei* extract with RNAi silenced TbGK expression (Fig 1A-B). Anti-TbLysoPLA
303 antibody specifically detected TbLysoPLA protein in WT *T.b. brucei*, but also its
304 ortholog in *T. congolense* at approximately 30 kDa, with comparable intensity when
305 normalized with the loading control PFR (Paraflagellar Rod) protein. No specific band
306 was observed in the KOTbLysoPLA strain extract (Fig 1A). Using anti-TbGK
307 antibodies, a band at the expected size slightly above 55 kDa was observed in both
308 extracts of *T.b. brucei* and *T. congolense* WT parasites. It was absent in the *T.b. brucei*
309 TbGK RNAi extract (Fig 1B).

310 **Expression and purification of recombinant proteins**

311 TbLysoPLA and TbGK fused to GST and the hexa-histidine tag respectively were
312 purified by affinity chromatography (Fig 2). The TbLysoPLA protein cleaved off the
313 glutathione column showed a yield of 1 mg for 5 mL of initial bacterial culture. The
314 purity was very high-quality as shown by SDS-PAGE (Fig 2A). TbGK was eluted from
315 the Ni-NTA column by competition with imidazole at high concentration (Fig 2B). The
316 production yield of TbGK was 1-2 mg for 5 mL of initial bacterial culture. The last
317 collected fractions of TbGK were also of quality purity as shown in Fig 2B. Finally, the
318 concentration of purified proteins obtained was adequate for use in ELISA antibody
319 detecting test (Ab-ELISA).

320 **Assessment of the diagnostic potential of TbLysoPLA and TbGK taken** 321 **individually**

322 The reactivity of TbLysoPLA and TbGK were tested with different cattle sera from:
323 1/ *T. congolense* experimentally infected cattle (TcEIC); 2/ *T. congolense*, *T.b. brucei*

324 and *T. vivax* naturally infected cattle from the field (FS); 3/ *T.b. brucei* experimentally
325 infected cattle (TbbEIC). A total of 74 positive sera (37 TcEIC and 37 FS), 62 negative
326 sera (31 naives TcEIC sera and 31 FS sera) and 14 TbbEIC samples (10 positives and
327 4 naives) all randomized, were tested by Ab-ELISA. *T.b. brucei* whole trypanosome
328 lysate (TbWTL), *T. congolense* whole trypanosome lysate (TcWTL), and TcoCB1
329 antigen [9], were all used as reference antigens. The optimal cut-off value allowing to
330 differentiate positive from negative samples was fixed for each protein and control
331 antigen as detailed above.

332 *Experimentally T. congolense-infected bovine sera reactivity to TbLysoPLA and TbGK*

333 ELISA results normalized and presented as RPP (Relative Percent of Positivity)
334 from TcEIC samples show that TbLysoPLA protein is specifically recognized by
335 positive (infected) sera with a RPP median value of twelve, which is higher than the
336 RPP median value of negative (non-infected) sera (4) (Table 3). Statistical analysis
337 comparing the two median values showed very significant difference ($p=0.0007$)
338 demonstrating that TbLysoPLA discriminates between infected and non-infected cattle
339 (Table 3, Fig 3A). For the TbGK protein, there was no significant difference ($p=0.08$)
340 in RPP medians values between positive and negative sera (Fig 3A, Table 3)
341 compared to TcoCB1, TbWTL, and TcWTL, which showed highly significant
342 differences ($p<0.0001$) between sera from infected and non-infected cattle (Fig 3B).

343 *Naturally T.b. brucei, T. congolense and T. vivax infected bovine sera reactivity*

344 TbLysoPLA and TbGK showed slightly different reactivity between positive and
345 negative samples when using field sera (FS). This difference was statistically
346 significant by Mann-Whitney test comparing the RPP medians of positive to negative
347 sera. The p values were 0.03 for both TbLysoPLA and TbGK (Table 3), lower than
348 0.05, but the discrimination between positive and negative sera was not clear-cut (Fig
349 3C). The RPP medians of positive samples and negative samples were lower (Table
350 3) than the respective cut-off values of 28 and 50 for TbLysoPLA and TbGK in Table
351 5, respectively. As shown in Table 3, TbLysoPLA had RPP medians of 8 for negative
352 samples and 13 for positive samples. The RPP medians for TbGK were in the same
353 range, at 9 for negative samples and 11 for positive one. Although these sera are well
354 discriminated on total antigens (TbWTL and TcWTL) with a strong reactivity of the
355 positive samples, TcoCB1 shows the same pattern of response as TbLysoPLA and
356 TbGK (Fig 3D).

357 Experimentally *T.b. brucei*-infected bovine sera reactivity to TbLysoPLA and TbGK

358 Statistical power of the tests was lower when using TbbEIC samples than using
359 TcEIC and FS due to the smaller number available. Even so, the reactivity of *T.b.*
360 *brucei* positive bovine sera were specific and significantly different from negative
361 samples for both TbGK ($p=0.004$) and TbLysoPLA (slight weak, $p=0.03$) proteins
362 (Table 3). The RPP medians are shown in Fig S2.

363 Diagnostic potential of TbLysoPLA and TbGK as a mixture, and combined with 364 C25

365 Several studies have shown that the main limitation of single protein based
366 assays is often lack of sensitivity [10,11,21,22]. As expected, this pattern of response
367 is equally present for the two tested proteins. And as previously reported, both TcoCB1
368 [10] and C25 [11] displayed lower sensitivities with both field sera (Fig 3D, TcoCB1)
369 and experimental sera (Fig S1A, C25_SE). Thus, we sought to assess whether we
370 could potentiate the sensitivity of TbLysoPLA and TbGK based tests through
371 combining these two proteins, with each other in the first place, and then with C25. Fig
372 4 shows ELISA results of the two tested mixtures. Equimolar mix of TbLysoPLA and
373 TbGK discriminated significantly the sera of infected cattle from those of non-infected
374 cattle (Fig 4A-4C, Table 3). With TcEIC sera, the p value was $p<0.0001$ for both
375 TbLysoPLA_TbGK (a) and TbLysoPLA_TbGK_C25 (b) mixtures when comparing
376 positive and negative sera (RPP medians value shown in Table 3). The RPP medians
377 of the positive sera, 34 for a and 21 for b, were higher or closer to the respective cut-
378 off values, while RPP medians of negative sera, 17 for a and 10 for b, were smaller
379 (Fig 4A). Similar results were observed with FS sera (Field sera, Fig 4C, Table 3). With
380 the TbbEIC sera, TbLysoPLA_TbGK mixture did not show any difference between
381 positive and negative samples ($p = 0.52$) while TbLysoPLA_TbGK_C25 combination
382 could discriminate sera of *T.b. brucei* infected cattle from non-infected ones ($p = 0.002$,
383 Table 3, Fig S2). As mentioned above however, statistical power was lower because
384 of the fewer samples tested.

385 Comparison of global diagnostic performance of individual protein testing vs. 386 mixtures based testing

387 By plotting the RPP values and comparing positive to negative samples, the sera
388 reactivity to protein mixtures is higher than that of proteins individually testing. To

389 compare the global diagnostic performance of the different tests, we did a ROC
390 analysis that allowed to determine for each ELISA test the sensitivity (Se), specificity
391 (Sp), likelihood ratio (LR) and the area under the curve (AUC) (Tables 4 and 5). The
392 LR value presented for each protein corresponds to the highest value, leading to the
393 determination of the optimal cut-off value that efficiently discriminate positive from
394 negative sera (Table 4 and 5). The ROC curve expressing the true positive rate (Se)
395 versus false positive rate (1-Sp) and making visualization of the AUC has been
396 established for each test (Fig 4B-4D). The latter is the best parameter in ROC analysis
397 to get the global diagnostic performance.

398 Based on the AUC values, protein mixtures displayed the most accurate
399 diagnostic performance compared to individual protein (Fig 4B-4D, Table 4 and 5). In
400 fact, the AUC value varies from 0.5 (powerless diagnostic) to 1 which is the most
401 powerful diagnostic performance value. In table 4 and 5, the proteins tested individually
402 show an AUC value ranging from 0.62 (TbGK) to 0.74 (TbLysoPLA) for TcEIC sera
403 and from 0.65 (TbLysoPLA) to 0.66 (TbGK) for FS sera. These values are all lower
404 than proteins combinations AUC values (≥ 0.78) which are close to 1. In regard to Se
405 and Sp, TbGK showed the lowest Sp (54.8%) but an acceptable Se (73%) for TcEIC
406 sera. TbLysoPLA showed a Se comparable to TbWTL reference antigen (~54%) and
407 a satisfactory Sp of 80.6%. Both TbGK and TbLysoPLA displayed lower Se and Sp
408 values compared to the reference antigen TcWTL Se (97%) and Sp (96%) with TcEIC
409 sera (Table 4). As hypothesized, the protein combinations Sp were higher at 87% for
410 TbLysoPLA_TbGK (a) and 91% for TbLysoPLA_TbGK_C25 (b) compared to individual
411 proteins. However, the Se was moderate for a (~61%) and lower for b (43%) (Table 4).

412 With field sera (FS), both TbLysoPLA and TbGK showed very high Sp values at
413 96.8 and 93.5% respectively, close or identical to the reference antigen Sp (96.8%)
414 (Table 5), but Se were very poor (<28%). Conversely, protein combinations displayed
415 a significant increase in Se (~61%) compared to individual proteins, while Sp for both
416 remained satisfactory, 87% for a, ~96% for b (Table 5). In addition, the statistical
417 analysis comparing the RPP medians of positive and negative samples on mixtures
418 showed a highly significant difference between the two groups, contrasting with
419 individual protein where the difference is weak (FS on both proteins) or not significant
420 (TcEIC sera on TbGK) (Table 3).

421 In summary, recombinant protein mixtures used as antigens are much better than
422 each protein tested individually, although they do not meet the TcWTL (for TcEIC sera)

423 and TbWTL (for FS sera) control values regarding overall performance. Regarding the
424 ROC curves, AUC value increased for the proteins combinations as shown in Fig 4B-
425 4D. The Se/Sp pair for each protein and reference antigens are shown in Figure 5 to
426 better highlight differences.

427 Discussion

428 AAT is a severe constraint to livestock development in Sub-Saharan Africa. The
429 problem is exacerbated by increasing resistance to trypanocidal drugs triggered by
430 recurrent improper use of treatments (underdosing) due to insufficient support from
431 veterinary services, and the widespread use of counterfeit products [5,23]. A vaccine
432 would have been the most cost-effective method of control, but has so far remained
433 elusive [4,24]. Surveillance is unsatisfactory and chemotherapy inefficient, for lack of
434 the chief requirement, an adequate field diagnosis that follows ASSURED criteria
435 defined by **A**ffordability, **S**ensitivity, **S**pecificity, **U**ser-friendliness, **R**apidity and
436 robustness, be **E**quipment free, and **D**eliverable to end-users [25,26] or the newly
437 REASSURED criteria defined by **R**ead-time connectivity, **E**ase of specimen collection,
438 ASSURED [27]. While clinical signs are not pathognomonic [28], both microscopy and
439 PCR do not meet ASSURED neither REASSURED criteria. Existing antibody detection
440 tests based on whole trypanosome lysate are of limited use due to antigen
441 standardization issues [29,30], though are open to improvement through recombinant
442 technology. Several proteins have been evaluated for their diagnostic potential to
443 replace total antigens [11,31–33], but few have made it to the RDT stage.

444 In the present study, we evaluated two novel proteins, the lysophospholipase
445 (TbLysoPLA) and the glycerol kinase (TbGK), of *T.b. brucei* as candidates for AAT
446 serodiagnosis. In addition, we provided the proof of concept of an innovative approach
447 that consists of combining a set of recombinant proteins as antigens in a unique test.
448 Using Ab-ELISA, we showed that the two proteins TbLysoPLA and TbGK had poor
449 diagnostic performance when tested individually, but drastically improved their
450 sensitivity and specificity when combined with each other or with C25, to levels
451 comparable to reference tests, particularly when using field sera.

452 TbLysoPLA and TbGK had never been tested for diagnostic purposes. However,
453 we selected them to test their diagnostic potential based on their intrinsic properties,
454 immunogenicity for TbLysoPLA, abundance for TbGK. *In silico*, the two proteins

455 showed strong similarities with their orthologs in trypanosomes (over 60% for
456 TbLysoPLA and over 82% for TbGK) and low homology with bovine (<35%) and
457 *Piroplasma* (<15%) orthologous proteins. In addition, TbLysoPLA has seven predicted
458 epitopes, including five shared with its ortholog in *T. congolense* (data not shown). This
459 strengthens the rationale for using it as an antigen in diagnosis with a low risk of cross-
460 reaction with other parasite infections. The fact that TbGK shares a high similarity with
461 both cattle (58%) and *Piroplasma* (45-55%) suggests a low immunogenicity. It may not
462 be the case however. TbGK presents on its sequence fourteen predicted epitopes, and
463 it is not uncommon for certain conserved proteins to induce a strong antibody
464 response, as was demonstrated for heat shock proteins, otherwise involved in protein
465 maturation [11,34].

466 As a whole, the evaluation of a protein for AAT serodiagnosis usually consists in
467 showing its specificity for a single species. This has been, among others, the case for
468 TvGM6 of *T. vivax* [33], and TcoCB1 of *T. congolense* [9]. However, a test allowing a
469 more comprehensive detection of the main pathogenic species such as *T. brucei s.l.*,
470 *T. congolense* and *T. vivax* would be more useful in an epidemiological context. We
471 have shown by western blot that both TbLysoPLA and TbGK orthologs of *T.*
472 *congolense* are specifically recognized by specific antibodies directed against their
473 orthologs of *T.b. brucei*. This makes possible the use of these proteins for the detection
474 of *T. congolense* infections. Pertaining to their diagnostic potential, TbLysoPLA and
475 TbGK taken individually showed poor performances, including a very low sensitivity
476 with field sera (<28%), and a low specificity with experimental sera, 54% for TbGK, the
477 latter quite unusual for a recombinant protein. Low sensitivity and mediocre specificity
478 is quite typical of many proteins tested in serodiagnosis. For example, the rTES-30
479 protein showed only 30% of sensitivity for the detection of toxocariasis in cattle [22].
480 The HSP70 protein truncations tested for the serodiagnosis of *T. evansi* showed
481 sensitivity values ranging between 41-61%, and specificity values between 65-91%
482 [35], similar to our own results. Surprisingly, and despite these poor performances, the
483 combination of TbLysoPLA and TbGK showed an improved diagnostic potential. We
484 have shown that their equimolar mixture, combined or not with C25, was able to
485 discriminate very clearly between infected and non-infected cattle, whether sampled
486 during an experimental infection or in the field. Considering AUC as a global evaluation
487 parameter, the mixtures showed AUC values of 0.78 to 0.86 higher than the proteins

488 tested individually and closer to the values of the reference antigens testings which
489 were up to ~1 for TcWTL applied on experimental sera. The individually proteins
490 testings showed a maximal AUC of 0.74 for TbLysoPLA and 0.66 for TbGK. This result
491 is in agreement with other studies including the combination of RoTat1.2 and ISG75 in
492 the serodiagnosis of *T. evansi* [36] and the combination of three *Leishmania infantum*
493 proteins identified from cDNA in antibody detection ELISA [37].

494 Our study was limited by the small number of sera from *T.b. brucei* experimentally
495 infected cattle available, and also by the absence of sera from *T. vivax* experimentally
496 infected cattle. We used mainly sera from *T. congolense* infected animals to assess
497 tests performances. The use of a *T.b. brucei* proteins to diagnose *T. congolense* or *T.*
498 *vivax* infections could account in part for the low sensitivity observed, in particular with
499 field sera on proteins used individually. Likewise, the hexa-histidine tag of TbGK had
500 not been cleaved off the recombinant protein. The presence of this tag could affect the
501 nature of the epitopes that TbGK possesses, and reduce its immunogenicity, as indeed
502 tags can modify epitopes, especially conformational epitopes [38]. Finally, we could
503 not assess the cross-reactivity of TbLysoPLA and TbGK with sera from cattle infected
504 with *Piroplasma (Babesia, Theileria)* for lack thereof.

505 In summary, the combined approach of bioinformatics and ELISA testing has
506 allowed the identification of strong candidates for the serodiagnostics of
507 trypanosomose. We showed for the first time in the context of AAT diagnosis especially
508 in *T. congolense*, *T. vivax* and *T.b brucei* infection, the improved performance of a
509 mixture as compared to the same proteins taken individually in an ELISA test. These
510 mixtures of two or more proteins, while there is room for improvement, are way more
511 sensitive and/or specific than proteins tested individually. The still moderate sensitivity
512 observed (~60%) can no doubt be improved by combining additional immunoreactive
513 proteins or part ones in these mixtures. The use of synthetic peptides encompassing
514 the most immunodominant epitopes would improve standardization as proposed by
515 Magalhães *et al.* (2017) for leishmaniasis serodiagnosis. Finally, for the sake of ease
516 and cost of production, and also of standardization, genetically-engineered chimeras
517 composed of epitopes of several proteins can be envisaged.

518 **Figures Legends**

519 **Fig 1. Cross-detection of TbLysoPLA and TbGK orthologs on *T. congolense* total**
520 **extract by western blot.** Western blot analysis of TbLysoPLA (**A.**) and TbGK (**B.**) in
521 wild type (WT) parasites (Tb427 and TcIL3000), in Δ TbLysoPLA KO (knockout of
522 TbLysoPLA gene) and Δ TbGK RNAi (RNA interference of TbGK mRNA in Tb427). The
523 PFR (Paraflagellar Rod) protein was used as loading control.

524 **Fig 2. TbLysoPLA and TbGK proteins purification.** Purification of TbLysoPLA (**A.**)
525 by affinity chromatography on GE glutathione sepharose 4B. Lanes F1-F4 correspond
526 to the collected fraction after GST release by thrombin cleavage. Nickel affinity
527 purification of TbGK-6xHis fusion protein (**B.**) on HisPur™ Ni-NTA resin. Lanes 1-4:
528 washes; lanes 5-8 : imidazole elution fractions.

529 **Fig 3. Evaluation of the diagnostic potential of TbLysoPLA and TbGK in indirect**
530 **ELISA. (A-B)** bovine sera from *T. congolense* experimental infection. **(C-D)** Field sera
531 from *T. congolense*, *T. vivax* and *T.b. brucei* naturally infected cattle. A total of 74
532 positive (infected) and 62 negative (non-infected) samples were tested. TcoCB1
533 antigen was used as recombinant antigen control and TbWTL, TcWTL (*T.b. brucei* and
534 *T. congolense* total lysates respectively) were used as reference antigens (current OIE
535 recommended antigens in AAT diagnosis). The optimal cut-off value for each antigen
536 is shown by a red dashed line.

537 **Fig 4. Protein equimolar mixtures as antigen in Ab-ELISA and ROC curve**
538 **comparison between individual proteins and mixtures. (A.)** bovine sera from *T.*
539 *congolense* experimental infection (37 positive and 31 negative sera). **(B.)** ROC curve
540 of antigens tested with experimental sera: TbLysoPLA (triangle), TbGK (dot),
541 TbLysoPLA_TbGK (square) and TbLysoPLA_TbGK_C25 (rhombus). **(C.)** field sera
542 from *T.b. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* mixed infection (37 positives and 31
543 negatives sera). **(D.)** ROC curve of antigens tested with field sera (same legends as in
544 B). The optimal cut-off value (in A and C) for each antigen is shown in red dashed line.
545 The global diagnostic performance was defined by AUC value.

546 **Fig 5. Sensitivity and specificity relationship at optimal cut-off for each test and**
547 **comparison with controls. (A.)** Bovine sera from experimental *T. congolense*
548 infection. **(B.)** Field sera from *T. b. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* infected cattle.

549 **Supplementary Figures:**

550 **Fig S1. (A-B).** C25 protein in single antigen Ab-ELISA test with experimentally *T.*
551 *congolense*-infected bovine (TcEIC) sera (A) and field naturally *T. congolense*, *T. vivax*
552 and *T.b brucei* infected bovine sera, field sera, FS (B). **(C-F).** ROC curve analysis :
553 C25 (C-D), TcoCB1 and references antigens (TbWTL, TcWTL) testing with TcEIC (E)
554 and FS sera (F).

555 **Fig S2.** TbLysoPLA, TbGK, C25, TbWTL and proteins mixtures as antigens in Ab-
556 ELISA with experimentally *T.b. brucei* infected bovine (TbbEIC) sera. The figures
557 represent the RPP medians values with their 95% CI values for infected and non-
558 infected bovine sera.

559

560 Conflict of Interest

561 The authors declare no conflict of interest for the publication of this paper.

562 Funding

563 This work was funded by the French Government (Agence Nationale de la Recherche)
564 Investissement d’Avenir programme, Laboratoire d’Excellence (LabEx) “French
565 Parasitology Alliance For Health Care” (ANR-11-LABX-0024-PARAFRAP),
566 programme PhD pays du sud. Experiment costs were supported by Université de
567 Bordeaux and CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche
568 agronomique pour le développement). Finally, CIRDES (Centre International de
569 Recherche-Développement sur l’Élevage en zone Subhumide) also supported this
570 research.

571 Acknowledgements

572 We are grateful to all technical staff of CIRDES especially to S. Sylla, H. Sakande, M.
573 Bamba and L. Millogo who facilitated the search and selection of samples among the
574 numerous serum banks and their technical support.

575 Author contributions

576 Conceptualization: AB, DB, LR, ST, MT

577 Data curation: MT

578 Formal analysis: MT

579 Funding acquisition: LR, DB, ST

580 Investigation: MT

581 Methodology: MT

582 Supervision: AB, DB, LR, ST

583 Validation: AB

584 Visualization: MT

585 Writing – original draft: MT

586 Writing – review & editing: ST, DB, AB, LR, FB

587 References

588 1. Desquesnes M, Holzmuller P, Lai D-H, Dargantes A, Lun Z-R, Jittaplapong S.
589 *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History,
590 Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. BioMed
591 Research International. 2013;2013: 1–22. doi:10.1155/2013/194176

- 592 2. Taylor K, Authié EM-L. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In The
593 Trypanosomiasis (ed. Maudlin, I., Holmes, P. H. and Miles, M. A.). CAB
594 International, Wallingford, UK. The Trypanosomiasis. CAB International,
595 Wallingford, UK. 2004. pp. 331–353.
- 596 3. FAO. The disease | Programme Against African Trypanosomosis (PAAT) | Food
597 and Agriculture Organization of the United Nations. 2020.
- 598 4. Horn D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Molecular and Biochemical*
599 *Parasitology*. 2014;195: 123–129. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.05.001
- 600 5. Chitanga S, Marcotty T, Namangala B, Bossche PV den, Abbeele JVD, Delespoux
601 V. High Prevalence of Drug Resistance in Animal Trypanosomes without a History
602 of Drug Exposure. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5: e1454.
603 doi:10.1371/journal.pntd.0001454
- 604 6. Hailu M. Review on Diagnostic Methods of Trypanosomosis. *Journal of Dairy &*
605 *Veterinary Sciences*. 2019;11. doi:10.19080/JDVS.2019.11.555812
- 606 7. Desquesnes M, Bossard G, Thévenon S, Patrel D, Ravel S, Pavlovic D, et al.
607 Development and application of an antibody-ELISA to follow up a *Trypanosoma*
608 *evansi* outbreak in a dromedary camel herd in France. *Veterinary Parasitology*.
609 2009;162: 214–220. doi:10.1016/j.vetpar.2009.03.033
- 610 8. Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other
611 mammals using DEAE-cellulose. *Experimental Parasitology*. 1970;28: 521–534.
612 doi:10.1016/0014-4894(70)90120-7
- 613 9. Mendoza-Palomares C, Biteau N, Giroud C, Coustou V, Coetzer T, Authié E, et al.
614 Molecular and Biochemical Characterization of a Cathepsin B-Like Protease Family
615 Unique to *Trypanosoma congolense*. *Eukaryotic Cell*. 2008;7: 684–697.
616 doi:10.1128/EC.00405-07
- 617 10. Boulangé A, Pillay D, Chevtzoff C, Biteau N, Comé de Graça V, Rempeters L,
618 et al. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal
619 African trypanosomosis. *Veterinary Parasitology*. 2017;233: 32–38.
620 doi:10.1016/j.vetpar.2016.11.017
- 621 11. Boulangé A, Katende J, Authié E. *Trypanosoma congolense*: Expression of a
622 Heat Shock Protein 70 and Initial Evaluation as a Diagnostic Antigen for Bovine
623 Trypanosomosis. *Experimental Parasitology*. 2002;100: 6–11.
624 doi:10.1006/expr.2001.4667
- 625 12. Balogun EO, Inaoka DK, Shiba T, Kido Y, Nara T, Aoki T, et al. Biochemical
626 characterization of highly active *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase, a
627 promising drug target. *The Journal of Biochemistry*. 2013;154: 77–84.
628 doi:10.1093/jb/mvt037
- 629 13. Johnson NP. Advantages to transforming the receiver operating characteristic
630 (ROC) curve into likelihood ratio co-ordinates. *Statistics in Medicine*. 2004;23:
631 2257–2266. doi:https://doi.org/10.1002/sim.1835
- 632 14. Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most
633 appropriate test cut-off value: the case of tests with continuous results. *Biochem*
634 *Med (Zagreb)*. 2016;26: 297–307. doi:10.11613/BM.2016.034
- 635 15. Van den Bossche P. Some general aspects of the distribution and epidemiology
636 of bovine trypanosomosis in southern Africa. *International Journal for Parasitology*.

- 2001;31: 592–598. doi:10.1016/S0020-7519(01)00146-1
- 638 16. Misset O, Bos OJM, Opperdoes FR. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma*
639 *brucei*. European Journal of Biochemistry. 1986;157: 441–453.
640 doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09687.x
- 641 17. Moody A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. Clinical Microbiology
642 Reviews. 2002;15: 66–78. doi:10.1128/CMR.15.1.66-78.2002
- 643 18. Peng S-Y, Lee K-M, Tsaihong JC, Cheng P-C, Fan P-C. Evaluation of
644 recombinant fructose-1,6-bisphosphate aldolase ELISA test for the diagnosis of
645 *Schistosoma japonicum* in water buffaloes. Research in Veterinary Science.
646 2008;85: 527–533. doi:10.1016/j.rvsc.2008.02.005
- 647 19. Odongo S, Sterckx YG, Stijlemans B, Pillay D, Baltz T, Muyldermans S, et al.
648 An Anti-proteome Nanobody Library Approach Yields a Specific Immunoassay for
649 *Trypanosoma congolense* Diagnosis Targeting Glycosomal Aldolase. PLoS Negl
650 Trop Dis. 2016;10: e0004420. doi:10.1371/journal.pntd.0004420
- 651 20. Pinto Torres JE, Goossens J, Ding J, Li Z, Lu S, Vertommen D, et al.
652 Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma*
653 *congolense* infections. Scientific Reports. 2018;8. doi:10.1038/s41598-018-26732-
654 7
- 655 21. Irumva V, Waihenya R, Mwangi AW, Kipkemboi P, Kaneko S, Teya T, et al.
656 Evaluation of the TbgI2 and TbgI17 Tandem Repeat Antigens as Potential Antigens
657 for the Diagnosis of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Open Journal of Clinical
658 Diagnostics. 2019;9: 152–163. doi:10.4236/ojcd.2019.94011
- 659 22. Santos LMD, Donassolo RA, Berne ME, Leite FPL, Avila LF da C, Scaini CJ, et
660 al. The serodiagnostic potential of recombinant proteins TES-30 and TES-120 in an
661 indirect ELISA in the diagnosis of toxocariasis in cattle, horses, and sheep. PLoS
662 ONE. 2019;14: e0213830. doi:10.1371/journal.pone.0213830
- 663 23. Bengaly Z, Vitouley SH, Somda MB, Zongo A, Têko-Agbo A, Cecchi G, et al.
664 Drug quality analysis of isometamidium chloride hydrochloride and diminazene
665 diacetate used for the treatment of African animal trypanosomosis in West Africa.
666 BMC Veterinary Research. 2018;14: 361. doi:10.1186/s12917-018-1633-7
- 667 24. Kristjanson PM, Swallow BM, Rowlands GJ, Kruska RL, de Leeuw PN.
668 Measuring the costs of African animal trypanosomosis, the potential benefits of
669 control and returns to research. Agricultural Systems. 1999;59: 79–98.
670 doi:10.1016/S0308-521X(98)00086-9
- 671 25. Peeling RW, Mabey D. Diagnostics for the control and elimination of neglected
672 tropical diseases. Parasitology. 2014;141: 1789–1794.
673 doi:10.1017/S0031182014000973
- 674 26. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Diagnostics for the
675 developing world. Nature Reviews Microbiology. 2004;2: 231–240.
676 doi:10.1038/nrmicro841
- 677 27. Land KJ, Boeras DI, Chen X-S, Ramsay AR, Peeling RW. REASSURED
678 diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and
679 improve patient outcomes. Nature Microbiology. 2019;4: 46–54.
680 doi:10.1038/s41564-018-0295-3
- 681 28. Desquesnes M, Dávila AMR. Applications of PCR-based tools for detection and

- 682 identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. *Veterinary*
683 *Parasitology*. 2002;109: 213–231. doi:10.1016/S0304-4017(02)00270-4
- 684 29. Ijagbone IF, Staak C, Reinhard R. Fractionation of trypanosome antigens for
685 species-specific sero-diagnosis. *Vet Parasitol*. 1989;32: 293–299.
686 doi:10.1016/0304-4017(89)90040-x
- 687 30. Desquesnes M, Bengaly Z, Millogo L, Meme Y, Sakande H. The analysis of the
688 cross-reactions occurring in antibody-ELISA for the detection of trypanosomes can
689 improve identification of the parasite species involved. *Annals of Tropical Medicine*
690 *& Parasitology*. 2001;95: 141–155. doi:10.1080/00034983.2001.11813624
- 691 31. Fleming JR, Sastry L, Wall SJ, Sullivan L, Ferguson MAJ. Proteomic
692 Identification of Immunodiagnostic Antigens for *Trypanosoma vivax* Infections in
693 Cattle and Generation of a Proof-of-Concept Lateral Flow Test Diagnostic Device.
694 *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10: e0004977.
695 doi:10.1371/journal.pntd.0004977
- 696 32. Fleming JR, Sastry L, Crozier TWM, Napier GB, Sullivan L, Ferguson MAJ.
697 Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for *Trypanosoma congolense*.
698 Jardim A, editor. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8: e2936.
699 doi:10.1371/journal.pntd.0002936
- 700 33. Pillay D, Izotte J, Fikru R, Büscher P, Mucache H, Neves L, et al. *Trypanosoma*
701 *vivax* GM6 Antigen: A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal
702 Trypanosomosis in Cattle. Rodrigues MM, editor. *PLoS ONE*. 2013;8: e78565.
703 doi:10.1371/journal.pone.0078565
- 704 34. Shinnick TM. Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic
705 pathogens. *Heat shock proteins and immune response*. 1990; 145–160.
- 706 35. Kumar J, Chaudhury A, Bera BC, Kumar R, Kumar R, Tatu U, et al. Production
707 and preliminary evaluation of *Trypanosoma evansi* HSP70 for antibody detection in
708 Equids. *Acta Parasit*. 2015;60: 727–734. doi:10.1515/ap-2015-0104
- 709 36. Rogé S, Van Reet N, Odiwuor S, Tran T, Schildermans K, Vandamme S, et al.
710 Recombinant expression of trypanosome surface glycoproteins in *Pichia pastoris*
711 for the diagnosis of *Trypanosoma evansi* infection. *Veterinary Parasitology*.
712 2013;197: 571–579. doi:10.1016/j.vetpar.2013.05.009
- 713 37. Magalhães FB, Castro Neto AL, Nascimento MB, Santos WJT, Medeiros ZM,
714 Lima Neto AS, et al. Evaluation of a new set of recombinant antigens for the
715 serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. Schallig HDFH,
716 editor. *PLOS ONE*. 2017;12: e0184867. doi:10.1371/journal.pone.0184867
- 717 38. Singh M, Sori H, Ahuja R, Meena J, Sehgal D, Panda AK. Effect of N-terminal
718 poly histidine-tag on immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae* surface protein
719 SP0845. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;163: 1240–1248.
720 doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.056
- 721

Table 1. Percentage of homology of TbLysoPLA and TbGK and their orthologs

Protein	<i>T.b. brucei</i>	<i>T. congolense</i>	<i>T. vivax</i>	<i>Leishmania infantum</i>	<i>Bos taurus</i>	<i>Babesia bovis</i>	<i>Theileri a parva</i>	Species
TbLysoPLA ^a	-	71.9	62.4	53.0	32.1	5.30	10.4	<i>T. b brucei</i>
		-	61.8	53.8	34.0	12.9	6.80	<i>T. congolense</i>
			-	51.9	34.2	6.30	20.0	<i>T. vivax</i>
TbGK ^b	-	88.3	82.0	60.4	58.3	45.3	55.8	<i>T. b brucei</i>
		-	82.0	59.6	57.8	45.6	38.6	<i>T. congolense</i>
			-	57.3	57.3	46.2	37.6	<i>T. vivax</i>

^a *T. b brucei* lyophospholipase. ^b *T. b brucei* glycerol kinase

Table 2. Antigenic peptides of TbLysoPLA and TbGK predicted using BepiPred-2.0 prediction

No	Start	End	Peptide	Length	Score
<i>T.b. brucei</i> lysophospholipase ^a					
1	7	12	ENLTAN	6	0.529
2	29	55	GCIEQKDLQEKLEKTRETELITHGLKY	27	0.583
3	60	66	QIGNRQS	7	0.546
4	107	117	MQPVGINGGAV	11	0.576
5	122	139	YDIRNVSSGNGVTEDAEA	18	0.619
6	202	211	EKILPQLCNK	10	0.556
7	250	260	SYPMEHSSHPK	11	0.537
<i>T.b. brucei</i> glycerol kinase ^b					
1	22	49	RQRPVSVHQVPHQTQHTPHPGWLEHDPME	28	0.515
2	63	74	AKLRQKDASFRK	12	0.490
3	93	97	VTKEP	5	0.469
4	107	131	LRTYDITKKVTAELGGGDSMFASKI	25	0.503
5	153	165	PAVADACRRGTLC	13	0.473
6	197	244	DLRTRKWSPPELCEKLIKIPMETLPEIRSNSELFYVETDECGVAAALNE	48	0.517
7	285	294	GEEARFSKHG	10	0.537
8	303	308	VGRDGP	6	0.492
9	328	350	RRNMNLFSHITECEKLARSVPGT	23	0.528
10	365	370	PYWDP	6	0.481
11	377	383	GMTLKTT	7	0.493
12	408	414	RDAGLNL	7	0.491
13	441	447	ILVPSMH	7	0.482
14	465	509	WTSLEEVKAVSRRENSWKTVSPSGSAMEREMIAEWREALKRTKW	45	0.533

^a Threshold at 0.52. ^b Threshold at 0.45

Table 3. Statistical analysis of infected vs. non-infected samples comparison for single protein and mixture testings

Sample type	TcEIC sera (<i>T. congolense</i>)								FS sera (<i>T. congolense</i> , <i>T. vivax</i> , <i>T.b. brucei</i>)							
	TbGK		TbLysoPLA		TbLysoPLA _TbGK		TbLysoPLA _TbGK_C25		TbGK		TbLysoPLA		TbLysoPLA _TbGK		TbLysoPLA _TbGK_C25	
Evaluated antigens	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
Sample status	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
RPP median	13	23	4	12	17	34	10	21	9	11	8	13	17	39	4	23
(n)^b	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)	(31)	(37)
p-value^a	0.08		0.0007		<0.0001		<0.0001		0.03		0.03		0.0007		<0.0001	
NI vs I	ns		***		****		****		*		*		***		****	
	TbbEIC sera (<i>T.b. brucei</i>)															
RPP median	74.5	106	18	31	2	3	15.5	42								
(n)^b	(4)	(10)	(4)	(10)	(4)	(10)	(4)	(10)								
p-value^a	0.004		0.03		0.52		0.0020									
NI vs I	**		*		ns		**									

NI (Non-infected), I (Infected), RPP (Relative percentage of positivity),

TcEIC (*T. congolense* experimentally infected cattle),

FS (*T. congolense*, *T.b. brucei* and *T. vivax* naturally field infected cattle),

TbbEIC (*T.b. brucei* experimentally infected cattle)

^a p-value calculated by Mann-Whitney non-parametric test.

^b number of tested samples (n)

ns (no significant),

* (weak significant difference),

** (significant difference),

*** (very significant difference),

**** (highly significant difference).

Table 4. Diagnostic performance parameters determined by ROC analysis of single antigen and mixture testings using sera of *T. congolense* experimentally infected cattle in ELISA

	Cut-off	Se (%)	95% CI	Sp (%)	95% CI	LR	AUC	95% CI
Single antigen test								
TbGK	> 13.5	73.0	57.0-84.6%	54.8	37.8-70.8%	1.62	0.624	0.48-0.77
TbLysoPLA	> 11.5	54.1	38.4-69.0%	80.6	63.7-90.8%	2.79	0.735	0.61-0.86
Combination test								
TbLysoPLA_TbGK	> 30.5	60.9	40.8-77.8%	87.0	67.9-95.5%	4.67	0.864	0.75-0.98
TbLysoPLA_TbGK_C25	> 24.5	43.5	25.6-63.2%	91.3	73.2-98.5%	5.00	0.821	0.70-0.94
Reference antigens								
CB1	> 38.5	64.9	48.8-78.2%	96.8	83.8-99.8%	20.1	0.946	0.90-0.99
TcWTL	> 8.50	97.3	86.2-99.9%	96.8	83.8-99.8%	30.2	0.991	0.97-1.00
TbWTL	> 27.5	56.8	40.9-71.3%	93.5	79.3-98.9%	8.80	0.889	0.81-0.97

Cut-off: Threshold value dividing the test result into positive and negative

Se %: percent sensitivity and its 95% confidence interval (95% CI)

Sp %: percent specificity and its 95% confidence interval (95% CI)

AUC : Area under the curve and its 95% confidence interval (CI)

LR: Likelihood Ratio

Table 5. Diagnostic performance parameters determined by ROC analysis of single antigen and mixture testings with field sera (sera from *T.b. brucei*, *T. congolense* and *T. vivax* infected cattle) in ELISA

	Cut-off	Se (%)	95% CI	Sp (%)	95% CI	LR	AUC	95% CI
Single antigen test								
TbGK	> 50.0	10.8	4.29-24.7%	96.8	83.8-99.8%	3.35	0.658	0.53-0.79
TbLysoPLA	> 28.0	27.0	15.4-43.0%	93.5	79.3-98.9%	4.19	0.651	0.52-0.78
Combination test								
TbLysoPLA_TbGK	> 37.5	60.9	40.8-77.8%	87.0	67.9-95.5%	4.67	0.784	0.65-0.92
TbLysoPLA_TbGK_C2	> 17.5	60.9	40.8-77.8%	95.7	79.0-99.8%	14.0	0.857	0.75-0.97
References antigens								
CB1	> 26.5	21.6	11.4-37.2%	96.8	83.8-99.8%	6.70	0.710	0.59-0.84
TcWTL	> 11.5	67.6	51.5-80.4%	96.8	83.8-99.8%	20.9	0.900	0.83-0.97
TbWTL	> 14.5	83.8	68.9-92.3%	96.8	83.8-99.8%	26.0	0.949	0.90-1.00

Cut-off: Threshold value dividing the test result into positive and negative

Se %: percent sensitivity and its 95% confidence interval (95% CI)

Sp %: percent specificity and its 95% confidence interval (95% CI)

AUC : Area under the curve and its 95% confidence interval (CI)

LR: Likelihood Ratio

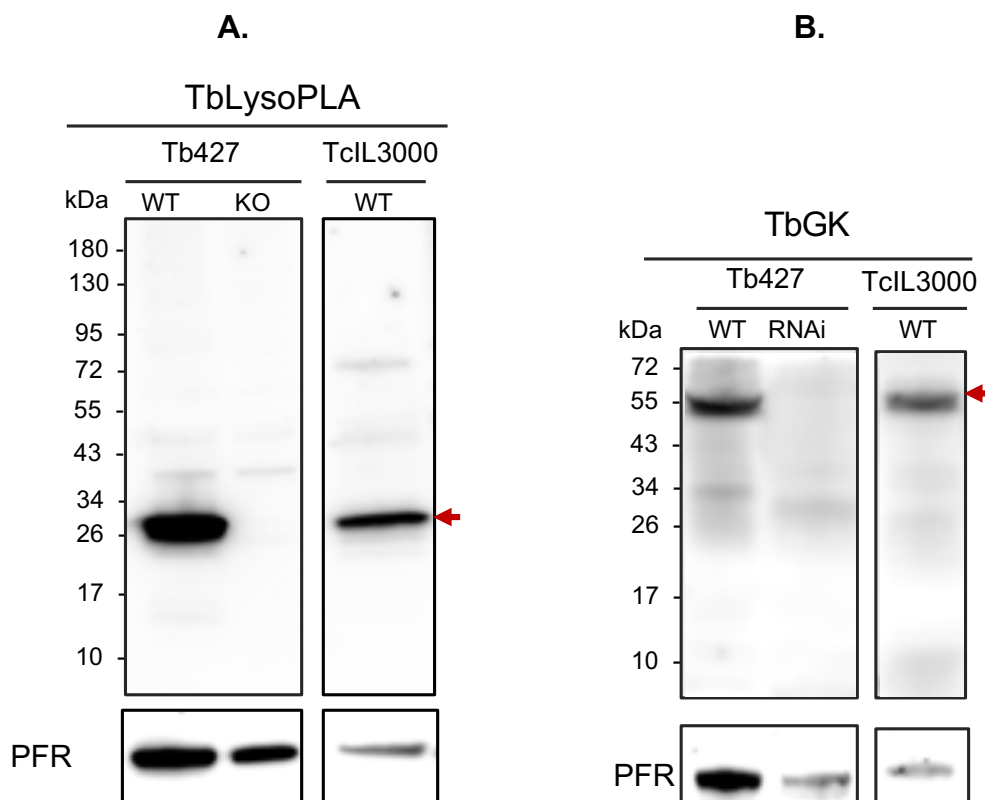


Fig 1.

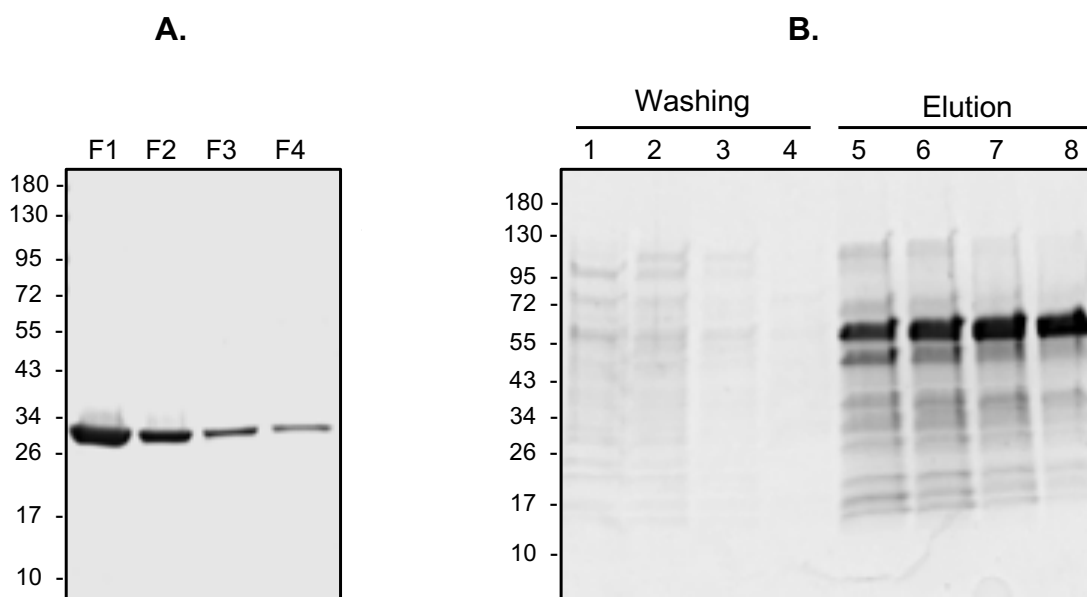


Fig 2.

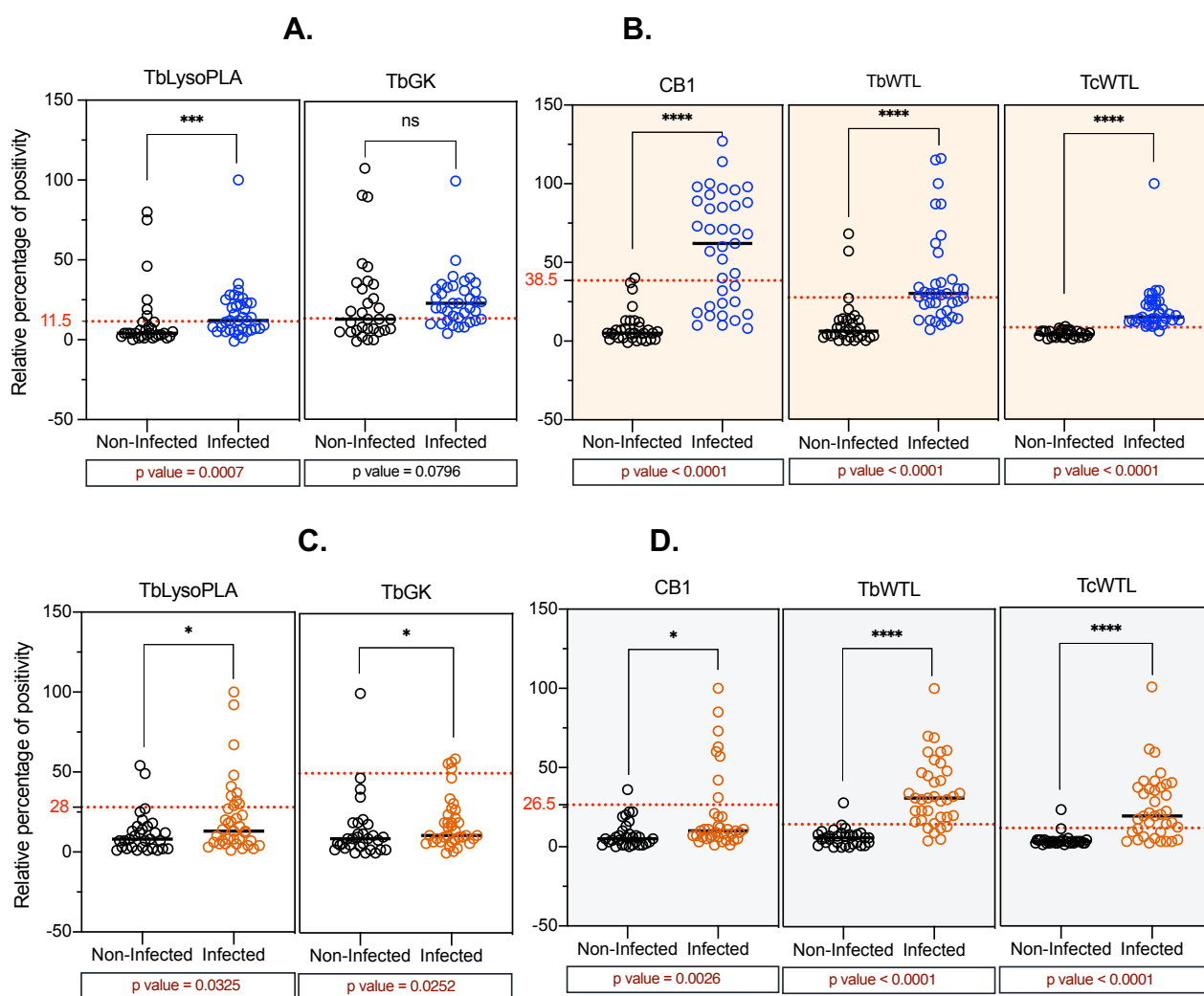


Fig 3.

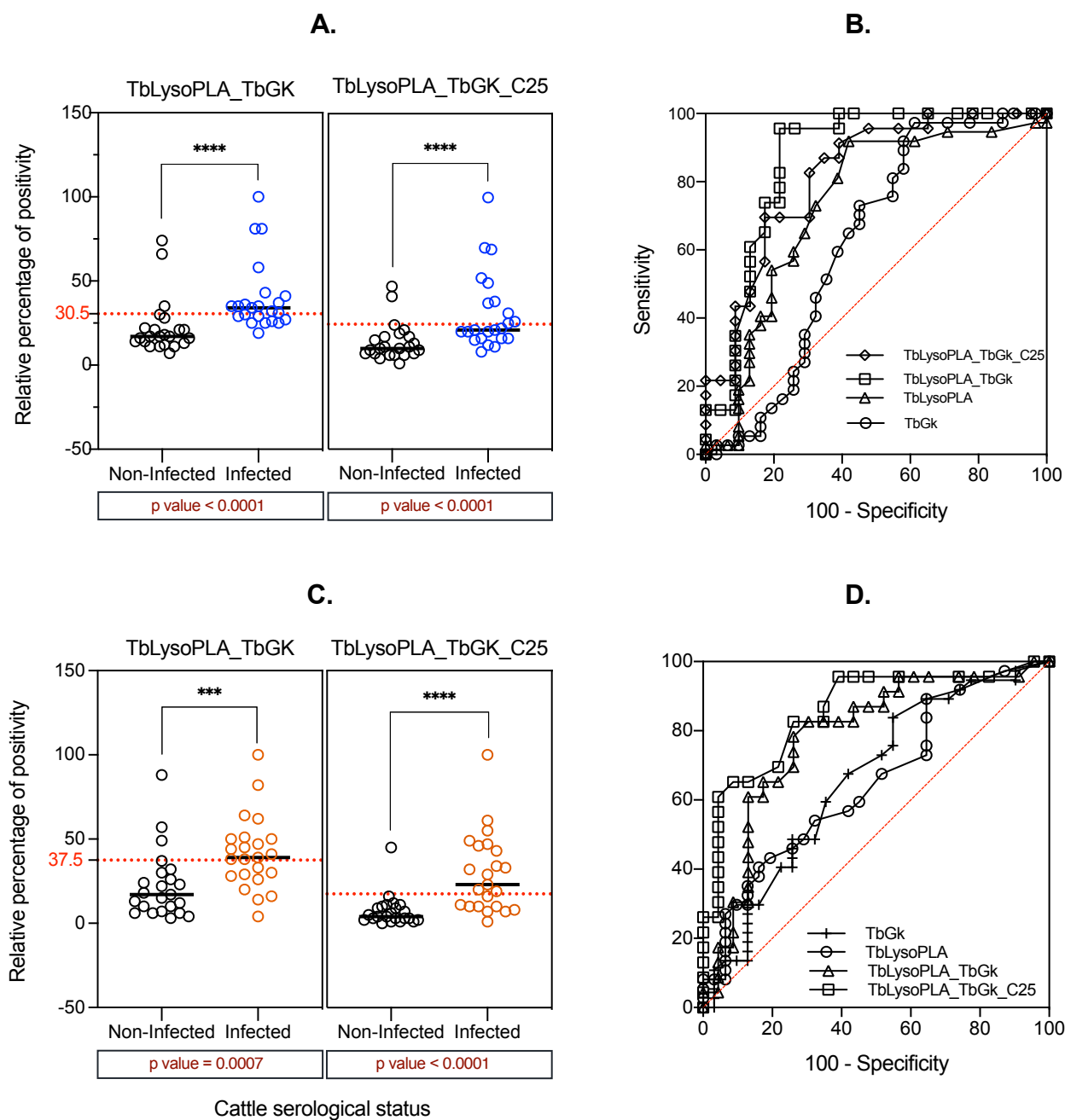


Fig 4.

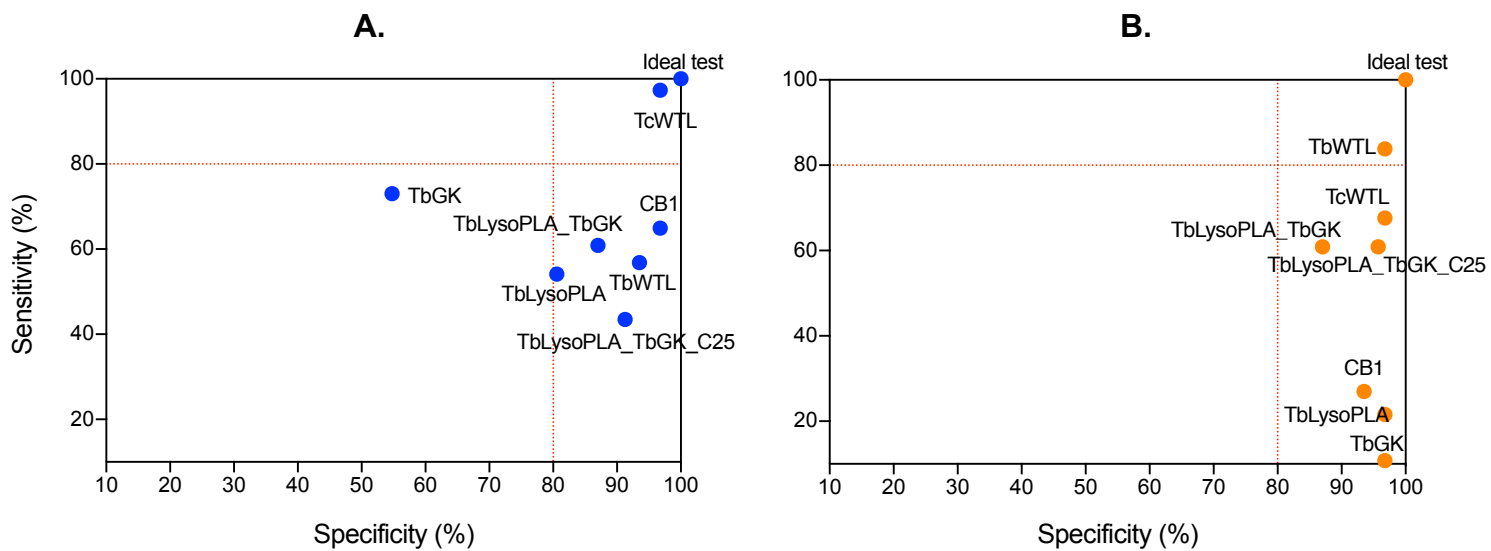


Fig 5.

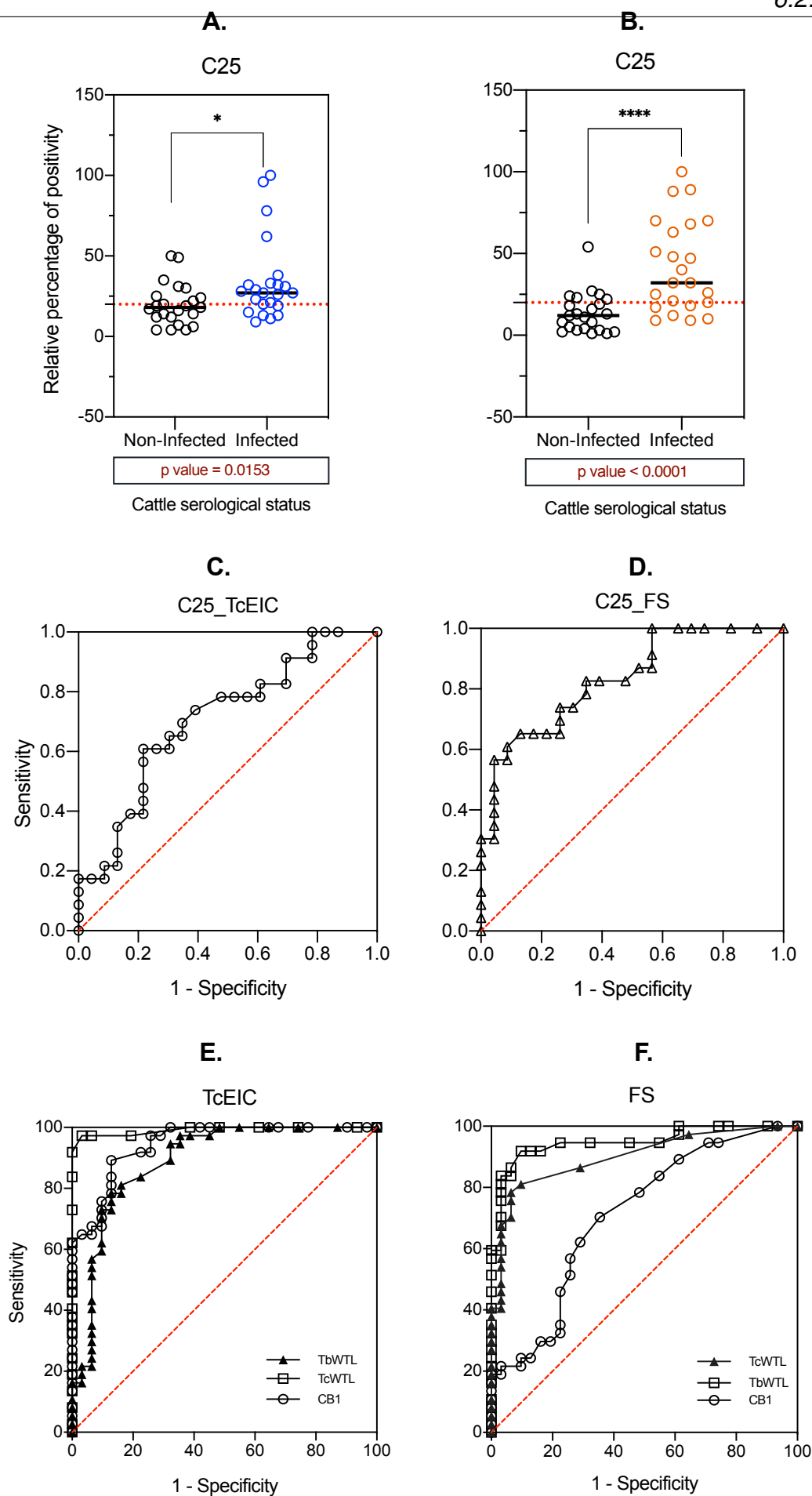


Fig S1.

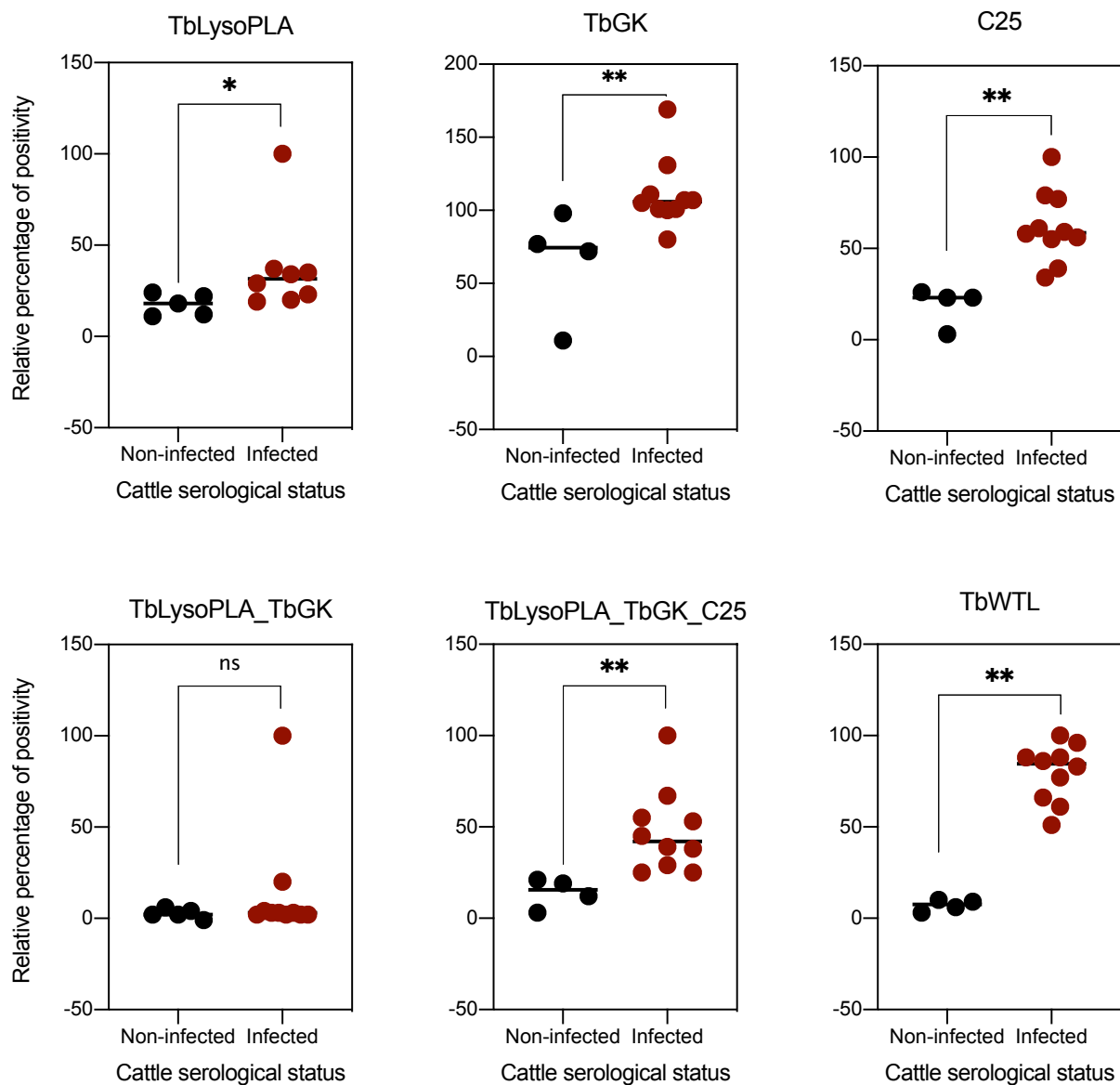


Fig S2.

7 | Test de nouveaux candidats à inclure dans une combinaison de protéines recombinantes pour un diagnostic efficace de la trypanosomose animale

Toukara M^{1,4,5*}, Boulangé A^{2, 3, 4}, Thévenon S^{2, 3}, Bringaud F¹, Bélem AMG⁶, Bengaly Z⁵, Berthier D^{2, 3}, Rivière L¹.

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

2 CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France

3 INTERTRYP, Univ Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France

4 CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

5 Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

6 Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

*magamba.toukara@gmail.com

7.1 Introduction

L'évaluation de protéines recombinantes individuelles dans les tests de détection d'anticorps pour la trypanosomose animale a montré ses limites dans un grand nombre d'études. En général, les protéines individuelles ont présenté une spécificité accrue mais ont manqué de sensibilité en comparaison avec les lysats totaux des parasites. C'est notamment ce qui a été observé pour les protéines HSP70 et TeGM6 pour la détection de *T. evansi* (Kumar et al., 2015, Nguyen et al., 2014) entre autres. C'est encore plus problématique dans les phases d'infection précoce et tardive, où mêmes les plus prometteuses des protéines échouent à la détection de trypanosomes comme observé par Pillay *et al.* (2013) (Boulangé et al., 2017, Pillay et al., 2013).

Dans la première activité de cette thèse, nous avons démontré que la combinaison de protéines entre elles dans un seul test permettait de maintenir une spécificité

élevée et d'améliorer la sensibilité pour la détection de trypanosomes par ELISA indirect (Toukara et al., en préparation). L'exploration de cette nouvelle approche pour la TAA pourrait permettre de développer un test sérologique pan-trypanosome très utile dans un contexte épidémiologique avec une performance égalant celle obtenue avec les tests utilisant des lysats totaux de parasites. Ce test sera surtout précieux dans la mesure où il palliera en plus le problème de standardisation. Dans cette perspective, nous avons évalué d'autres protéines recombinantes dans le but d'identifier un mélange hautement immunoréactif. Dans ce chapitre, nous abordons la sélection, la caractérisation *in silico*, le clonage, la purification et l'évaluation du potentiel diagnostique de huit autres protéines de trois espèces de trypanosomes impliquées dans la TAA.

À partir d'une analyse exhaustive de la bibliographie et une analyse croisée des données générées préalablement à cette thèse dans des études parallèles : transcriptomique et protéomique dans les laboratoires impliqués dans cette thèse, nous avons sélectionné une dizaine de protéines candidates. Sur les dix molécules initialement retenues, huit ont été clonées avec succès et six exprimées dans les bactéries BL21. Parmi les six protéines exprimées, seulement trois ont pu être purifiées (TvcMDH, TbgBiP et TcG3PDH). L'analyse comparative des leurs séquences avec leurs homologues ou orthologues a montré que les trois protéines étaient très conservées chez les trypanosomes. En ELISA indirect de détection d'anticorps, TvcMDH a une faible sensibilité (Se), 47,6% pour les sérums issus d'infection expérimentale (SE) de bovins par *T. congolense* IL1180 et 28,6% pour sérums de bovins infectés naturellement (sérums de terrain, ST) par les trois espèces de trypanosomes : *T. congolense*, *T. vivax* et *T. b. brucei*. TbgBiP montre une meilleure Se, 71 et 57% pour SE et ST respectivement. Leur combinaison telles qu'elles ou avec C25 n'affecte pas la spécificité (Sp) qui est supérieure à 90% mais la Se de TbgBiP diminue. Quand ces trois protéines sont combinées avec la lysophospholipase de *T. b. brucei* (TbLysoPLA), la Se diminue pour les SE mais augmente significativement pour les ST avec une Sp élevée. La TcG3PDH n'a pas montré une performance notable.

7.2 Matériels et méthodes

7.2.1 Matériels

Les matériels utilisés dans cette étude sont tous décrits dans le chapitre 5. Les échantillons de sérums utilisés sont présentés dans le tableau 5.4 : 40 sérums expérimentaux de GALVmed (*T. congolense* IL1180) et 40 de sérums de terrain (*T. congolense*, *T. vivax* et *T. b brucei*). Dans chaque lot, il y avait 20 sérums négatifs et 20 sérums positifs. Les plasmides et les amorces utilisés pour le clonage sont présentés respectivement dans les tableaux 5.2 et 5.3.

7.2.2 Méthodes

7.2.2.1 Sélection de protéines candidates

Pour sélectionner des nouveaux candidats, une analyse exhaustive de la bibliographie et des données disponibles dans les laboratoires d'accueils (UMR-5234-MFP Université de Bordeaux et l'UMR Intertryp Montpellier) a été réalisée. Des protéines déjà identifiées ont été considérées et des données protéomiques et transcriptomiques ont été croisées. Dans l'étude transcriptomique, réalisée dans un contexte d'infection de souris avec *T. congolense* IL3000, 153 gènes de *T. congolense* ont été retrouvés très exprimés. En parallèle, une étude protéomique avait montré qu'il y avait plus de 1200 protéines sécrétées, retrouvées dans le surnageant de culture de *T. congolense*. Ces données croisées ont permis d'identifier 41 candidats potentiels. Parmi ces candidats dix protéines candidates incluant certaines déjà décrites dans la littérature ont été retenues (Tableau 7.1).

7.2.3 Du clonage à l'évaluation du potentiel diagnostique de protéines par ELISA

Toutes les méthodes utilisées ont déjà été décrites dans le chapitre 5. De façon globale et synthétique, la méthodologie adaptée est la suivante : pour chaque protéine sélectionnée, les séquences homologues chez les trypanosomes et orthologues chez les bovins, les piroplasmes et *Anaplasma* ont été alignées en utilisant le logiciel Ge-

TABLE 7.1 – Les épitopes prédits pour les différentes protéines sélectionnées, les vecteurs et les enzymes de clonage.

Protéine	<i>Trypanosoma</i>	Épitopes prédits ^a	Plasmide de clonage	Enzymes de restriction	Tag	Fusion (kDa)
Bibliographie						
Cathepsine L-like protease (TbCP)	<i>T. b brucei</i>	12	pGEXT4-1, pETSUMO	EcoRI-NotI, EcoRI-XhoI	GST	64
TcCP	<i>T. congolense</i>	12	pGEXT4-1	EcoRI-XhoI	GST	72-73
TvCP	<i>T. vivax</i>	12	pGEXT4-1	EcoRI-XhoI	GST	72-73
Binding immunoglobulin Protein (TbgBiP)	<i>T. brucei</i>	16	pET28 α	NA ^b	6xHis	71,5
Malate déshydrogénase cytosolique (TvcMDH)	<i>T. vivax</i>	7	pETSUMO	EcoRI-NotI	SUMO-6xHis	48,8
Données croisées						
Protéine de point chaud du rétrotransposon 2 (TcRHS2)	<i>T. congolense</i>	22	pETSUMO	BamHI-Sall	SUMO-6xHis	--
Glycérol-3-phosphate déshydrogénase (TcG3PDH)	<i>T. congolense</i>	7	pETSUMO	BamHI-Sall	SUMO-6xHis	48-49
Protéine hypothétique (TcHyp)	<i>T. congolense</i>	5	pETSUMO	BamHI-Sall	SUMO-6xHis	--

^a Seuil de prédiction de 0,5

^b Plasmide recombinant fourni par Alain Boulangé

GST : Glutathion S-transférase, 6xHis : 6x Histidine

neious v4.8 pour déterminer leur degré d'homologie (deux à deux). L'immunogénicité des protéines a été prédite via l'algorithme de prédiction d'épitopes linaires Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 (au seuil de 0,5) de la base de données IEDB. Les gènes de protéines sélectionnées ont ensuite été clonés dans des plasmides d'expression bactériens avec des étiquettes « tag » de purification (voir sous-sous-section 5.2.1.4). Les plasmides recombinants ont été utilisés pour transformer les bactéries BL21 D3. Après transfert du système d'expression au CIRDES, ces bactéries ont été cultivées et à leur phase de croissance, l'expression de protéines a été induite avec 1 mM de l'IPTG. Les culots bactériens ont été lysés par un cycle de congélation/décongélation et sonication dans 4 tampons de lyse, pour tester la solubilité de protéines. Les protéines solubles ont été purifiées directement par chromatographie d'affinité grâce à leurs tags. Les protéines insolubles ont été solubilisées dans un tampon à 8 M d'urée puis dialysé avant évaluation. Toutes les étapes d'expression et de purification ont été vérifiées par SDS-PAGE. Un lot de sérums positifs et négatifs de bovins infectés expérimentalement avec *T. congolense* et un lot de sérums des bovins infectés naturellement par *T. congolense*, *T. vivax* et *T. b brucei* ont été testés en ELISA indirect sur chacune des protéines, individuellement et sur quelques mélanges/cocktails de ces protéines. Le test de comparaison de rangs de Mann-Whitney a été réalisé pour comparer la ré-

activité de sérums négatifs à celle de sérums positifs sur chaque antigène. En outre, les paramètres de mesure de précision du test ELISA, la sensibilité (Se), la spécificité (Sp) et l'aire sous la courbe ROC (AUC), ont été calculés pour chaque protéine à un cut-off optimal déterminé selon la méthode Johnson (2004) (Johnson, 2004) via le logiciel Graph Pad Prism par l'analyse ROC (Receiver operating characteristic).

7.3 Résultats

7.3.1 Analyse *in silico* de TvcMDH, de TbgBiP et de TcG3PDH

Les huit protéines sélectionnées dans cette étude sont présentées dans le tableau 7.1. Sur les huit, deux ont déjà été décrites dans la littérature en diagnostic de la trypanosomose animale : la cathépsine L-like de *T. vivax* (Eyssen et al., 2018) et la protéine TbgBiP plus précisément son homologue chez *T. congolense* (Bossard et al., 2010, Boulangé et al., 2002). Ces deux protéines sont comptées parmi les protéines les plus immunogéniques des trypanosomes. L'analyse immuno-informatique pour la prédiction d'épitopes de lymphocytes B sur leurs séquences respectives a révélé la présence d'une douzaine d'épitopes sur chacune des cathépsines et ce, indépendamment de l'espèce de trypanosomes. Jusqu'à 16 épitopes ont été mis en évidence pour la protéine TbgBiP (Tableau 7.1). La protéine du rétrotransposon 2 de *T. congolense* a montré une vingtaine épitopes sur sa séquence (jusqu'à 22 épitopes). Cependant, c'est une protéine de grande taille, faisant jusqu'à 87 kDa. À l'inverse les protéines TvcMDH et TcG3PDH qui sont plus petites (36 kDa chacune) présentent sept épitopes chacune. La protéine hypothétique TcHyp encore plus petite (23 kDa) présente 5 épitopes. Ainsi, proportionnellement à leurs tailles, toutes ces protéines semblent être immunogéniques, du moins *in silico*.

Pour évaluer une éventuelle réaction croisée avec d'autres agents pathogènes du sang (chez les bovins) tels que les parasites *Piroplasma* ou *Anaplasma spp*, des alignements de séquences ont été effectués. Les séquences d'acide aminé de la protéine TvcMDH, de la protéine TbgBiP et de la protéine TcG3PDH ont été alignées respectivement avec leurs homologues (chez les trypanosomes) et orthologues (chez les bovins, *Piroplasma*, *Schistosoma spp*. et *Anaplasma spp*.). Les pourcentages d'homo-

logie déterminés sont présentés dans le tableau 7.2. Les résultats montrent que la protéine TvcMDH est conservée chez les trypanosomes. Elle partage jusqu'à 85,5% d'identité avec *T. b brucei* et 77,5% avec *T. congolense*. Elle présente très peu de similarité (homologie <30%) avec les autres parasites ou bactéries affectant le bétail. La protéine TbgBiP (qui est une HSP70) est bien plus conservée. Elle partage plus de 90% d'homologie chez les trypanosomes, mais également des fortes similarités avec le bovin (72,9%), *Theileria parva* (65,7%) et *Schistosoma bovis* (55,1%). Ce degré de conservation de la protéine BiP a surtout été observé au niveau de son domaine N-terminal (N-ter) comme discuté dans le chapitre précédent (Toukara et al., en préparation). La protéine TcG3PDH est également très conservée avec plus de 87% d'identité chez les trypanosomes. Elle est également très différente de ses orthologues avec moins de 30% d'homologie (Tableau 7.2).

TABLE 7.2 – Pourcentages d'homologie de TvcMDH, de TbgBiP et de TcG3PDH avec leurs homologues et orthologues.

TvcMDH	Identité	TbgBiP	Identité	TcG3PDH	Identité
<i>T. vivax</i>	...	<i>T. brucei brucei</i>	...	<i>T. congolense</i>	...
<i>T. brucei brucei</i>	85,5%	<i>T. congolense</i>	94,7%	<i>T. brucei brucei</i>	94.5%
<i>T. congolense</i>	77,5%	<i>T. vivax</i>	91,7%	<i>T. vivax</i>	87.3%
<i>Bos taurus</i>	52,0%	<i>Bos taurus</i>	72,9%	<i>Bos taurus</i>	27.9%
<i>Babesia bigemina</i>	16,6%	<i>Babesia bovis</i>	44,5%	<i>Babesia bigemina</i>	28.5%
<i>Theileria parva</i>	15,5%	<i>Theileria parva</i>	65,7%	<i>Theileria parva</i>	24.7%
<i>Anaplasma marginale</i>	25,5%	<i>Anaplasma marginale</i>	29,7%	<i>Anaplasma marginale</i>	28.7%
<i>Schistosoma bovis</i>	24,5%	<i>Schistosoma bovis</i>	55,1%	<i>Schistosoma bovis</i>	4.00%

7.3.2 Clonage, expression et purification des protéines

Pour pouvoir évaluer leur potentiel diagnostique, les gènes des protéines sélectionnées ont été clonés dans des plasmides d'expression bactériens en fusion avec des protéines étiquettes (ou « tag ») permettant leur purification (Tableau 7.1). Après un séquençage, pour vérifier la bonne insertion des ORFs (Open reading frame) et d'éventuelle mutation, les protéines ont été exprimées dans les bactéries BL21. Les protéines TcRHS2 et TcHyp qui présentaient un décalage du cadre de lecture n'ont pas pu être exprimées. Les cinq autres protéines ont toutes été exprimées après induction, aux tailles de protéines de fusion attendues (Figure 7.1A).

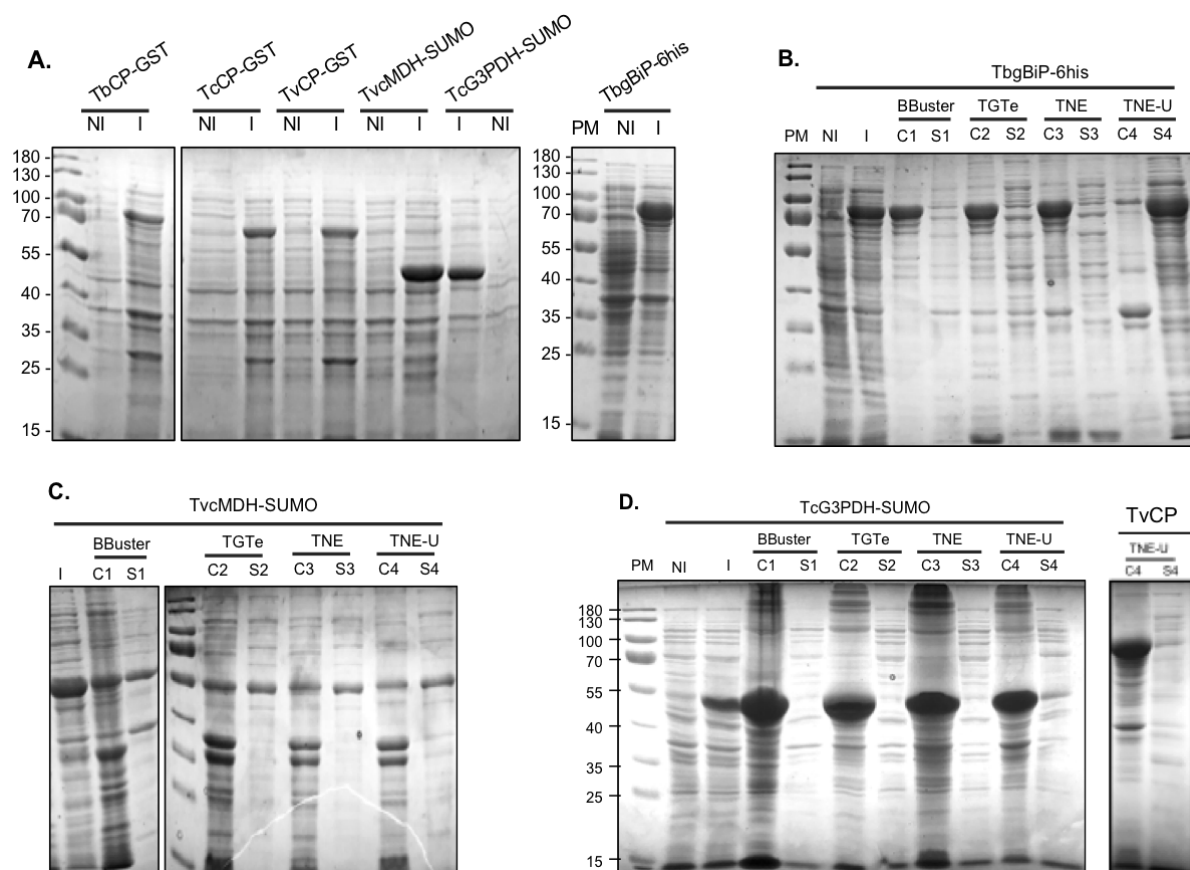


FIGURE 7.1 – Analyse de l'expression et de la solubilité de protéines sur gel SDS-PAGE. (A.) Expression par induction à l'IPTG dans les bactéries BL21 D3. (B-D.) Test de solubilité de protéines dans quatre tampons de lyse. BBuster : tampon bugbuster (commercial) ; TGTe (Tris-HCl pH8 50mM, Glycérol 10%, Triton x100 0,1%, EDTA 1 mM, Lysozyme 100 μ g/mL) ; TNE (Tris-HCl pH8 50 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Lysozyme 100 μ g/mL) ; TNE-U (tampon TNE, urée 1 M). NI (non-induit) ; I (induit) ; C : culot, S : surnageant, PM (marqueur de poids moléculaire en kDa).

Pour déterminer le tampon dans lequel les protéines sont solubles, un test de solubilité a été réalisé sur chacune des protéines exprimées. Au total, quatre tampons y compris le bugbuster (contenant le Triton X-100, un détergent), le TGTe (contenant un stabilisateur de protéines, le glycérol), le tampon TNE et son dérivé TNE-U (contenant de l'urée à faible concentration comme agent dénaturant) ont été testés. L'analyse des fractions solubles et des culots après lyse des bactéries montre que seules les protéines TvcMDH (dans tous les tampons) et TbgBiP (dans le tampon TNE-U) sont solubles (Figure 7.1B, 7.1C). Toutes les cathépsines et la protéine TcG3PDH sont, quant à elles, insolubles dans les quatre tampons de lyse testés (Figure 7.1D).

Les protéines TvcMDH et TbgBiP ont toutes les deux été exprimées en phase avec le tag 6xHis, hexa-histidine. En utilisant la résine métallique (microbilles de chélate métallique de nickel) chargée d'ions divalents (Ni^{2+}) ayant une affinité pour l'histidine, ces protéines ont été purifiées des protéines bactériennes par chromatographie d'affinité (Figure 7.2A, 7.2B). Au dosage, environ 4,76 mg et 5,1 mg ont été récupérés après élution respectivement pour TvCMDH et TbgBiP à partir d'une culture bactérienne de 100 mL.

Les cathépsines et la protéine TcG3PDH ont été isolés dans les corps d'inclusion, qui ont été purifiés après plusieurs lavages avec un tampon à 2 M d'urée. La protéine TcG3PDH a partiellement été solubilisée à 2 M d'urée (Figure 7.2C) contrairement aux cathépsines qui sont restées insolubles (Figure 7.2D). Ces corps d'inclusion ont ensuite été solubilisés dans 8 M d'urée. Après purification sur une résine de glutathion et d'histidine respectivement, les cathépsines et la TcG3PDH ont été dialysées. Les cathépsines se sont précipitées et seule la TcG3PDH a montré une fraction soluble (Figure 7.2E). Les fractions dialysées ont été centrifugées et 2 mg de TcG3PDH ont pu être récupérés (Figure 7.2F).

7.3.3 Évaluation du potentiel diagnostique de protéines

Pour évaluer l'immunoréactivité de ces trois protéines purifiées et la combinaison de TvcMDH, de TbgBiP telles quelles ou avec C25 (chapitre 6) et la combinaison des trois avec TbLysoPLA (chapitre 6) sous forme d'antigènes en ELISA indirect, deux

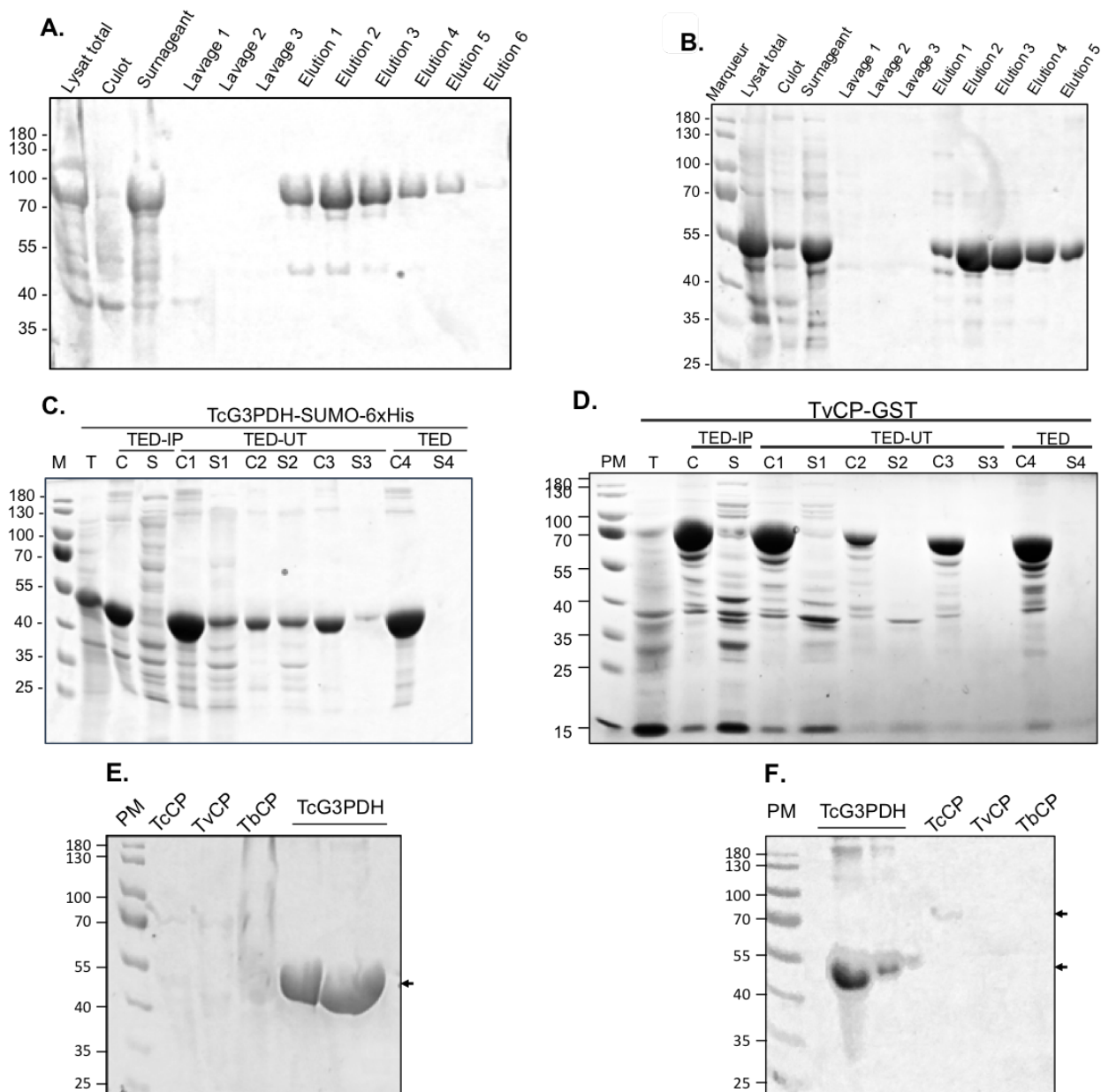


FIGURE 7.2 – Analyse de la purification de TvcMDH, de TbgBiP et de TcG3PDH par SDS-PAGE. (A-B.) Chromatographie d'affinité sur résine de nickel : TbgBiP (A) et TvcMDH (B). Purification des corps d'inclusion à partir des culots de bactéries exprimant la protéine TcG3PDH (C.) et les trois cathépsines (D. TvCP en exemple). Fractions solubles de cathépsines et de TcG3PDH dialysées et récupérées après chromatographie d'affinité (E. : avant centrifugation ; F. après centrifugation des fractions dialysées).

lots de sérums de bovins ont été utilisés : des sérums expérimentaux (SE) et des sérums de terrain (ST). Les résultats de l'évaluation de protéines individuelles montrent que les trois protéines permettent de distinguer les sérums expérimentaux positifs de sérums négatifs avec une différence statistiquement significative (Figure 7.3). Pour les sérums de terrain pour lesquels des infections mixtes (de *T.b brucei*, *T. congolense* et *T. vivax*) ont été mise évidence par PCR et par ELISA (sur les lysats totaux de trypanosomes), on observe une différence très significative entre échantillons négatifs et positifs pour la protéine TbgBiP ($p < 0,0001$) et aucune différence de réactivité pour TvcMDH et TcG3PDH ($p > 0,05$).

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que la combinaison de protéines d'immunoréactivité équivalente en ELISA indirect peut améliorer la sensibilité du test d'immunodétection par ELISA. Nous avons voulu tester cette approche pour des protéines qui semblent être d'immunoréactivités très différentes. La combinaison de TvcMDH (faiblement immunogénique) et de la protéine TbBiP (immunogénique) montre une différence statistiquement très significative entre échantillons négatifs et positifs à la fois pour les sérums expérimentaux (SE, $p = 0,007$) et pour les sérums de terrain (ST, $p = 0,0006$). Les résultats sont relativement similaires au test individuel de TbgBiP (Figure 7.3D). En les associant avec le domaine C-terminal de la protéine BiP de *T. congolense* nommé C25 (voir chapitre 6), les sérums positifs de terrain sont clairement distingués des sérums négatifs (Figure 7.3E, $p < 0,0001$). Cependant pour les sérums expérimentaux, la différence légère observée n'est pas significative statistiquement ($p = 0,069$). L'ajout au mélange de la protéine TbLysoPLA précédemment testée (chapitre 6) n'affecte pas les résultats qui restent très similaires à la précédente combinaison (Figure 7.3F).

En termes de performance globale basée sur les valeurs de sensibilité (Se), de spécificité (Sp) et d'AUC, la protéine TbgBiP est la plus performante comme attendu. Sa spécificité était de 95% (77-100, IC 95%) indépendamment du type de sérums (SE ou ST). Elle affiche une Se de 71% pour les SE et 57% pour les ST (Figure 7.3A). Les protéines TvcMDH et TcG3PDH montrent les mêmes Sp (91% pour SE et 95% pour ST) mais les Se observées pour la protéines TcG3PDH sont bien plus basses (16-37%) (Figure 7.3B-C). L'association de TvcMDH et TbgBiP n'affecte pas la Sp qui

est restée élevée ($Sp=95\%$), par contre on observe une réduction de la sensibilité par rapport à TbgBiP seule (de 71 à 57% pour SE et de 57 à 38% pour ST). Le même pattern de réactivité a été observé quand C25 a été ajouté au mélange (Figure 7.3E). À l'inverse, on observe une augmentation de la Se (62% pour le ST) via le mélange de ces trois protéines avec TbLysoPLA. La spécificité ($Sp \geq 91\%$) est maintenue (Figure 7.3F).

7.4 Discussion

Le concept de combinaison de protéines pour améliorer les performances des tests immunodiagnostiques a été évalué pour plusieurs maladies y compris le cancer colorectal (Karl et al., 2008), la leishmaniose (Magalhães et al., 2017), le *surra* (Rogé et al., 2013) et récemment pour la *nagana* (Tounkara et al., en préparation). L'objectif de la présente étude était de sélectionner et d'évaluer des nouveaux candidats protéiques à inclure dans une nouvelle combinaison d'antigènes pour le sérodiagnostic de la *nagana*. Pour ce travail, nous avons opté pour les molécules candidates déjà identifiées et d'autres issues des données générées par nos collaborateurs (UMR Intertryp Montpellier). Nous avons sélectionné dix protéines candidates parmi lesquelles les gènes de huit ont été clonés (trois cathépsines, la TvcMDH et TcG3PDH, TcRHS2 et TcHyp). Ces protéines ont été soumises à une analyse de prédiction d'épitopes et toutes ont présentées des peptides immunogéniques prédits sur leurs séquences au seuil optimal de prédiction (0,5). Le nombre d'épitopes prédits était proportionnel à la taille des protéines. Cette analyse confirme l'immunogénicité déjà décrite de TbgBiP (Bossard et al., 2010) et des cathépsines (Eyssen et al., 2018, Ortiz et al., 2009) et conforte l'idée de l'utilisation de TvcMDH, TcG3PDH, TcRHS2 et TcHyp comme antigènes en ELISA. En outre, l'analyse comparative des séquences de trois d'entre elles (TbgBiP, TvcMDH et TcG3PDH) avec leurs homologues a montré que toutes ces protéines étaient bien conservées. Tandis que la protéine TcG3PDH partage très peu de similarité avec ses orthologues chez les piroplasmes, *Anaplasma marginale*, *Schistosoma bovis* et bovins, la protéine TvcMDH partage 52% de similarité avec son orthologue chez les bovins. Cette forte similarité pourrait diminuer l'immunoréactivité de TvcMDH chez les bovins. D'autre part, la protéine TbgBiP présente également des

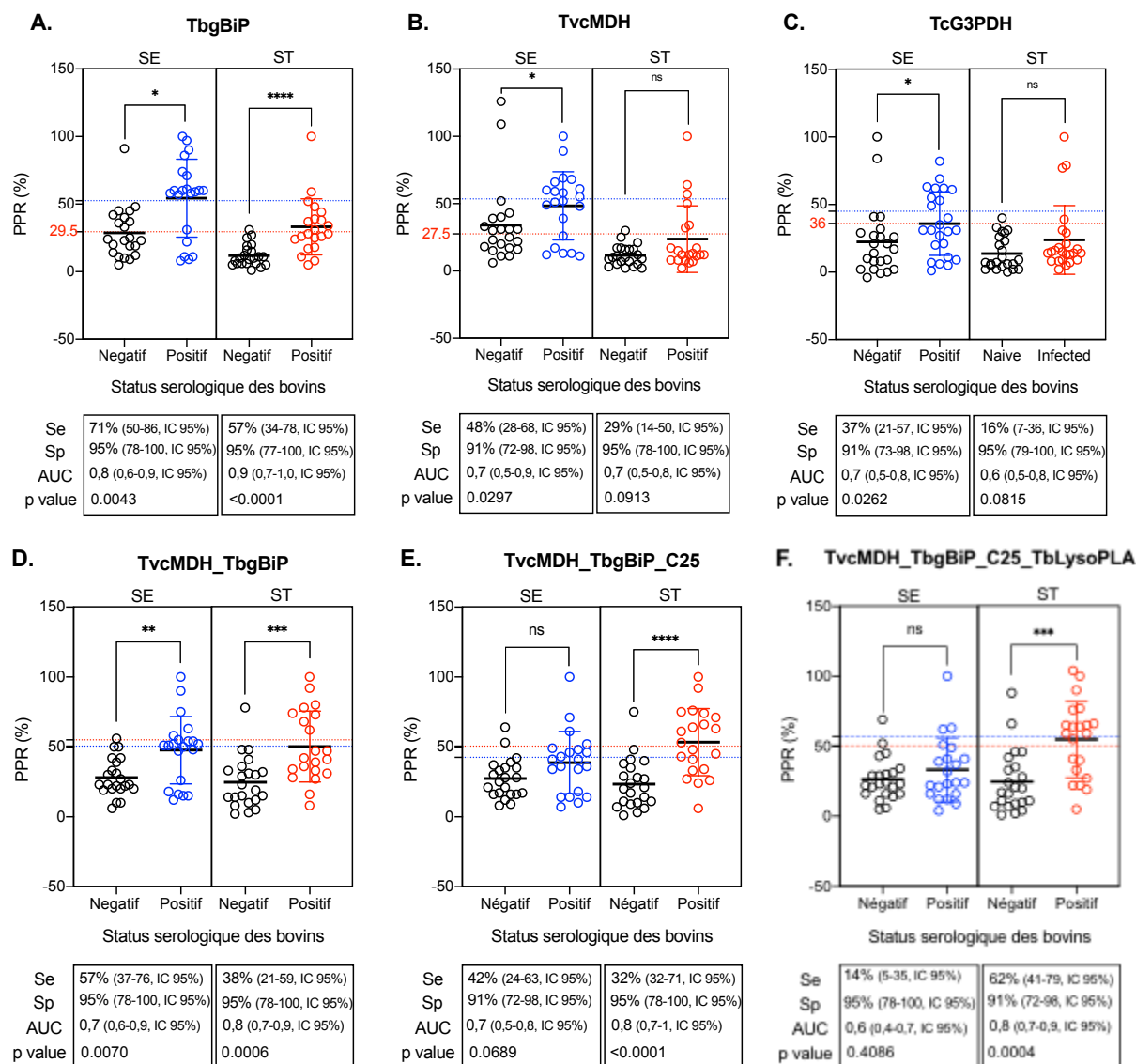


FIGURE 7.3 – Évaluation du potentiel diagnostique de protéines en ELISA indirect. (SE) Sérums d'infection expérimentale de bovins par *T. congolense*. (ST) Sérums de terrain provenant de bovins infectés naturellement par *T. congolense*, *T. vivax* et *T.b. brucei*. Un total de 40 échantillons positifs (infectés) et 40 négatifs (non infectés) ont été testés. (A-C.) tests de protéines individuelles ; (D-F.) tests des mélanges équimolaires de protéines. Cut-off (SE) : ligne pointillée bleu ; cut-off (ST) : ligne pointillée rouge. PPR : Pourcentage de positivité relative ($[\text{DO échantillon} - \text{DO contrôle conjugué}] \times 100 / \text{DO contrôle positif}$). Les paramètres de l'analyse ROC, Receiver operating characteristic, permettant d'évaluer la précision des tests : sensibilité (Se), spécificité (Sp) et AUC (Area under the curve, aire sous la sous courbe). La p value est issue de la comparaison de la réactivité de sérums négatifs aux sérums positifs par le test de Mann-Whitney. $p > 0,05$, ns (non significatif) ; $p < 0,05$ (significatif) avec *, **, ***, ****.

fortes similarités avec le bovin (72,9%), *Theileria parva* (65,7%) et *Schistosoma bovis* (55,1%). Toutefois, ce degré de conservation n'a pas d'effet sur l'immunogénicité de cette protéine connue pour posséder son domaine immunoréactif au niveau C-terminal qui semble très variable. Cette propriété de la TbgBiP a déjà été décrite chez son orthologue chez *T. congolense* (Boulangé et al., 2002) et chez d'autres HSP70 (Shinnick, 1990). Ces protéines semblent donc répondre aux critères d'inclusion dans un test de diagnostic.

Les molécules définies sous forme de protéines recombinantes ont été employées dans plusieurs tests pour pallier le problème de standardisation et améliorer la spécificité des tests de diagnostic (Boulangé et al., 2002, Fleming et al., 2014). Cependant, le clonage et la purification des protéines peuvent très vite constituer une étape limitante dans la production de ces molécules définies. Dans notre étude, les gènes de la protéine TcRHS2 et de TcHyP n'ont pas pu être clonés correctement du fait des problèmes d'amplification. Pour les six gènes clonés, toutes les protéines ont été exprimées normalement dans les bactéries BL21 après induction. L'expression hétérologue des protéines dans un système d'expression bactérien peut avoir plusieurs conséquences. Elle peut rendre les protéines insolubles avec formation des corps d'inclusions (niveau de surexpression élevé et protéines à ponts disulfures) ou les rendre inactives (Sørensen and Mortensen, 2005, Terpe, 2006). Ici, la contrainte majeure était la formation de corps d'inclusion. Un test de solubilité a été réalisé sur chacune des protéines exprimées. Pour les protéines TbgBiP et TvcMDH qui étaient solubles, un rendement de 5,1 et 4,76 mg respectivement a été obtenu après purification à partir d'une culture bactérienne de 100 mL. Comparativement à d'autres études, ces rendements sont meilleurs (Fleming et al., 2014). Comme attendu, toutes les cathépsines étaient insolubles dans les quatre tampons de lyse testés. En effet, il est connu que l'expression à des niveaux très élevés des protéines en fusion avec la GST conduit à une accumulation des protéines s'agrégeant dans les corps d'inclusions chez *E. coli* (revu dans Kimple et al., 2013). Ceci rend particulièrement difficile la purification de cathépsines. Il a été rapporté que la solubilisation à l'urée 8 M des cathépsines à partir des corps d'inclusion, entraîne la protéolyse spontanée de leur domaine N-terminal (Boulangé et al., 2001). Dans cette étude, nous avons opté pour un tagging en N-terminal car il est suggéré que l'immunogénicité des cathépsines est due à leur

domaine C-terminal (Boulangé et al., 2001), ce qui rend leur purification encore plus compliquée. Cependant, le choix de placer le tag du côté N-terminal était correct car une fusion de protéine tag en C-terminal aurait pu affecter cette immunogénicité. Pour les caractérisations enzymatiques, les cathépsines ont essentiellement été produites dans les systèmes d'expression eucaryotes notamment baculovirus (Boulangé et al., 2001) ou *Pichia pastoris* (Eyssen et al., 2018, Pillay et al., 2010). Ces systèmes pourraient être employés pour la prochaine expression de ces protéines. À l'inverse, la protéine TcG3PDH, qui était également insoluble mais exprimée en fusion avec le tag 6xHis, a pu être purifiée partiellement.

En ELISA indirect de détection d'anticorps, toutes les protéines, qu'elles aient été utilisées dans un test individuel (une seule protéine) ou en combinaisons de protéines, ont une Sp satisfaisante et élevée (91-95%) pour les deux types de sérums testés (SE et ST). En termes de Se et en excluant la protéine TbgBiP, toutes les protéines en test individuel ont montré des Se médiocres : TvcMDH (48% SE, 29% ST) et TcG3PDH (37% SE, 16% ST). En conséquence, ces deux protéines ne permettent pas de discriminer correctement les sérums négatifs de sérums positifs comparativement à TbgBiP (les valeurs moyennes PPR inférieures aux valeurs cut-offs). Cette faible immunoréactivité pourrait s'expliquer par la forte similarité que TvcMDH partage avec le bovin (52%) et probablement par un problème de renaturation au cours de la purification de TcG3PDH à partir des corps d'inclusion. Pour les tests ELISA, la TcG3PDH qui était dans un tampon à 2 M d'urée, a été dilué dans le tampon carbonate sans urée. Cela pourrait être responsable de l'agrégation de cette protéine (qui était déjà insoluble dans un tampon à 1 M d'urée) et empêcher sa fixation sur la plaque. Quand les protéines sont combinées, une Sp élevée est maintenue mais la Se diminue. Ceci pourrait s'expliquer par la différence d'immunoréactivité entre ces protéines. Cependant, le maintien de la forte spécificité (dans le test de combinaison) suggère que cette approche pourrait porter ces fruits en combinant deux protéines de bonne sensibilité de base et de même ordre d'immunogénicité (immunoréactivité équivalente). Il faut quand même noter que la Se augmente de façon significative quand on combine TvcMDH, TbgBiP avec C25 et TblLysoPLA pour les sérums de terrain. La diversité des anticorps, en réponse à la diversité des trypanosomes rencontrés sur le terrain, aurait favorisé cela. Si l'on considère que l'infection par les trois espèces de trypanosomes entraîne une

réponse immunitaire contre ces espèces, on peut également s'attendre à retrouver des anticorps qui reconnaissent spécifiquement les protéines de chaque espèce.

En conclusion, les protéines TvcMDH et TcG3PDH sont peu immunogéniques au vu des résultats. La protéine TbgBiP permet de discriminer les sérums négatifs des sérums positifs. La combinaison de protéines dans un test unique de détection d'anticorps permet de maintenir une grande spécificité. Quand la différence d'immunoréactivité est importante, la Se diminue mais pour les protéines d'immunoréactivité proche, la Se augmente significativement. Ces résultats permettent de mieux guider le choix d'association de protéines. D'autre part, l'augmentation de la Se pour la combinaison de quatre protéines montre l'importance d'inclure de protéines de chaque espèce de trypanosomes pour une détection pan-trypanosome.

Enfin, malgré l'évaluation de toutes ces protéines, la nécessité d'identifier de nouveaux candidats reste toujours importante car aucune des protéines testées, exceptée la TbgBiP, ne pourra être incluse dans un test de diagnostic rapide. D'où l'objet du prochain chapitre.

8 | Identification des nouvelles protéines immunoréactives dans le sécrétome de *T. congolense* : stratégie combinée de spectrométrie de masse, d'analyse d'immunodétection et immuno-informatique

Toukara M^{1,4,5*}, Thévenon S^{2, 3}, Boulangé A^{2, 3, 4}, Bringaud F¹, Dupuy J-W⁷, Bélem AMG⁶, Bengaly Z⁵, Berthier D^{2, 3}, Rivière L¹.

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

2 CIRAD, UMR INTERTRYP, F-34398 Montpellier, France

3 INTERTRYP, Univ Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France

4 CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

5 Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

6 Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

7 Plateforme Proteome, Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux Cedex

*magamba.toukara@gmail.com

8.1 Introduction

Trypanosoma congolense est l'un des principaux parasites responsables de la trypanosomose animale africaine, maladie qui affecte très négativement l'élevage des bovins et des petits ruminants. Au cours de l'infection de leurs hôtes, les trypanosomes ont une localisation extracellulaire dans laquelle ils excrètent des molécules qui affectent la physiologie de leur hôte (Silva Pereira et al., 2019, Tizard et al., 1978). Ces facteurs peuvent être des protéines sécrétées ou relarguées au cours de la lyse cellulaire (voir chapitre 3). La localisation de ces protéines font d'elles des cibles idéales pour le diagnostic. D'autres part, les protéines sécrétées peuvent constituer des biomarqueurs pouvant être ciblés à des fins thérapeutiques ou vaccinales. Malgré cette

importance, très peu d'études ont été effectuées sur le secrétome de trypanosomes africains (Geiger et al., 2010, Grebaut et al., 2009, Holzmuller et al., 2008).

Les deux chapitres précédents ont montré qu'il y a une nécessité de nouveaux tests d'immunodiagnostic. Les protéines qui ont été évaluées n'ont pas montré des performances optimales permettant leur inclusion dans des TDR. Toutefois, les résultats prometteurs de la combinaison de protéines offrent la possibilité d'explorer plus en détails cette nouvelle approche de combinaison de protéines pour le diagnostic de la TAA. L'objectif de cette étude était d'identifier des nouveaux candidats fiables et adaptés à évaluer dans un test de détection d'anticorps pour le sérodiagnostic de *T. congolense*. Dans ce chapitre, nous avons essayé de répondre à cet objectif en considérant deux objectifs spécifiques : 1-/ identifier et caractériser les protéines immunoréactives putatives du secrétome par une analyse protéomique du secrétome de *T. congolense* IL3000 et une analyse immuno-informatique, et 2-/ confirmer cette immunoréactivité par l'analyse de la réponse humorale (développée contre le secrétome) du système immunitaire de différentes races bovines. Nous avons pu identifier jusqu'à 142 protéines prédites comme hautement immunogéniques avec au moins 5 épitopes dans leurs séquences. Les tests de sérums de bovins infectés expérimentalement par *T. congolense* IL1180, ont quant-à-eux permis de détecter jusqu'à onze bandes entre 20 et 70 kDa du même ordre de taille moléculaire que celles identifiées en analyse immuno-informatique. Quand bien même d'autres expériences sont nécessaires pour valider l'identité des protéines détectées sur les immunoblots, ces résultats constituent une base solide pour la sélection et l'évaluation de nouvelles protéines candidates au sérodiagnostic.

8.2 Matériels et Méthodes

8.2.1 Matériels

8.2.1.1 Souche et culture de *T. congolense* IL3000

Dans cette étude, nous avons utilisé la souche IL3000 de *T. congolense*. Un stabillat de culture a été décongelé sur glace et 400 μ L de la suspension de parasites ont été ajoutés à 5 mL de milieu de culture MEM complet contenant du sérum de chèvre

dans une flasque de 25 cm². Les parasites ont été incubés pendant une nuit à 37°C puis maintenus en culture à 34°C dans une étuve à 5% de CO₂ dans un environnement humide. Pour amplifier la culture, les parasites adhérents ont été décollés de la flasque à l'aide d'un gratteur de cellule (Falcon® Cell Scrapers). Environ 2,5 mL de la suspension a été ajouté à 25 mL de milieu frais dans une flasque de 75 cm², soit une dilution de 1 :10. Ensuite, les parasites ont été incubés à 34°C, 5% de CO₂ jusqu'à confluence (entre 2 et 3 jours après inoculation du milieu frais).

8.2.1.2 Les échantillons de sérums de bovins

Un lot de 100 échantillons de sérums de bovins fournis par l'UMR Intertryp (Baillarguet, Montpellier, France) ont été utilisés. Ces échantillons sont issus du projet AAT-TOL qui visait à étudier les phénotypes des races de bovins trypanotolérants et trypanosusceptibles d'Afrique de l'Ouest. Au cours de ce projet, cinq races de bovins (Zébu peul, Borgou, Lagunaire, Baoulé et N'Dama) ont été infectées expérimentalement par *T. congolense* IL1180 (Berthier et al., 2015). Pour chaque race, cinq individus ont été sélectionnés et pour chaque individu, un échantillon de pré-infection (-2) et quatre échantillons post-infection aux dates (20, 26, 33 et 60) ont été sélectionnés. La réactivité de l'ensemble de ces échantillons (excluant la race Baoulé) a été évaluée sur le sécrétome de *T. congolense* IL3000.

8.2.2 Méthodes

8.2.2.1 Préparation du sécrétome de *T. congolense* IL3000

Une culture de *T. congolense* IL3000 à confluence dans une flasque 75 cm² a été raclée à l'aide du gratteur Falcon® Cell Scrapers. Les parasites décollés ont été centrifugés à 1800 rpm pendant 10 minutes. Le culot de cellules a été resuspendu dans 5 mL de PBS 1x puis re-centrifugé 10 minutes à 1800 rpm pour être lavé. Cette opération a été répétée une seconde fois et le culot a été resuspendu dans 1 mL de milieu MEM sans sérum. De cette suspension, un volume de 10 µL a été dilué au 1/100 et les parasites ont été comptés au microscope sur une cellule de Mallassez. Pour obtenir une préparation de sécrétome, 10⁸ parasites ont été incubés, pendant 16 h à 34°C et 5% CO₂, dans 4 mL de Milieu de sécrétion. Ce dernier était du milieu MEM sans sérum, un milieu stressant du fait de l'absence de sérum. À l'issue de cette incubation, l'intégrité

de cellules a été évaluée par l'observation au microscope. Le surnageant contenant le sécrétome a été séparé des parasites par centrifugation (1800 rpm, 10 minutes à 4°C) et filtré à l'aide d'un filtre à protéines à faible liaison de 0,45 µm. Le sécrétome a été concentré à 200 µL final par centrifugation en utilisant un concentrateur (Thermo Scientific™ Concentrateur de protéines Pierce™ en PES, 2 à 6 mL, 88516S) à un seuil de rétention des molécules à 10 kDa selon les instructions du fournisseur. Le tampon de charge pour le SDS-PAGE a immédiatement été ajouté à la préparation concentrée de 200 µL (soit 50 µL de tampon 4x). Le mélange a été bouilli à 100°C pendant 10 minutes et un aliquot a été analysé sur gel de polyacrylamide en comparaison avec le profil d'une préparation d'extrait total de *T. congolense* IL3000. Les échantillons ont ensuite été conservés à -20°C. Trois réplicats biologiques préparés dans les mêmes conditions ont été envoyés à la plateforme protéome de l'université de Bordeaux pour l'identification de protéines.

8.2.2.2 Analyse de la qualité du sécrétome sur gel de polyacrylamide

Le SDS-PAGE a été effectué sur les échantillons de sécrétome préparés ci-dessus. L'extrait total de *T. congolense* a été préparé en mélangeant 5×10^6 parasites dans 10 µL de SDS-2% (avec inhibiteurs de protéase) avec 5 µL de tampon de charge 4x et ensuite bouillit à 100°C pendant 10 minutes. Environ 15 µL d'échantillon de sécrétome et 15 µL d'extrait total ont été chargés sur un gel préfabriqué Mini-PROTEAN TGX 4-20% (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Les protéines ont été séparées à 200 V pendant 30-45 min dans le tampon Tris-Glycine-SDS (TGS) 1X. Après la migration, le gel a été lavé à l'eau distillée et coloré avec InstantBlue™ (Abcam, Cambridge, UK). Le gel a ensuite été photographié à l'imageQuant™ LAS 4000 (Cytiva, Washington, DC, USA).

8.2.2.3 Spectrométrie de masse : LC-MS/MS

L'identification de protéines par la spectrométrie de masse a été réalisée à la Plateforme Proteome de l'Université de Bordeaux selon le protocole décrit dans l'annexe 4 [page 186](#)) par Jean-William Dupuy.

8.2.2.4 Analyse de données protéomique

8.2.2.4.1 Bases de données et identification de peptides

Nous avons utilisé la base de données TriTrypDB : T.congo-IL3000 pour identifier les protéines.

8.2.2.4.2 Analyse de l'ontologie génétique (GO)

Les données GO (Gene Ontology) ont été obtenues directement en effectuant un enrichissement GO dans la base de données tritryp. Les ontologies ont été identifiées en considérant les processus biologiques, les fonctions moléculaires et les composants cellulaires. Les protéines ont été classées dans différentes catégories fonctionnelles avec un seuil fixé à 0,05. Ce seuil définit la probabilité qu'un terme GO (catégorie fonctionnelle) apparaisse parmi la liste de gènes identifiés par l'analyse de masse plus souvent qu'il n'apparaît dans l'ensemble des gènes de l'organisme en présence.

8.2.2.4.3 Prédiction des épitopes des cellules B

La présence des épitopes de lymphocytes B sur les séquences de protéines identifiées a été prédite via l'algorithme Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0 de la base de données IEDB. Les séquences peptidiques de taille comprise entre 5 et 30 acides aminés et prédites au seuil de 0,6 ont été considérées dans notre analyse.

8.2.2.4.4 Sélection de biomarqueurs de diagnostic pour la TAA

Les protéines identifiées par l'analyse protéomique du sécrétome ont été triées à plusieurs niveaux pour la sélection et l'identification des protéines immunogéniques. (i) Tout d'abord, nous avons sélectionné les protéines qui ont été détectées dans les trois échantillons de sécrétome analysés par LC-MS/MS. (ii) De cette liste, les protéines de taille comprise entre 20 et 70 kDa ont été sélectionnées. (iii) Les glycoprotéines variantes de surface (VSG, Variant surface glycoprotein) ont été éliminées et la présence d'épitopes de lymphocytes B a été réalisée sur chacune de protéine. Les protéines possédant trois épitopes ou plus ont été considérés. Les termes GO et la présence de peptide signal qui renseignent sur la localisation de protéines, ont été recherchés. (iv) Les protéines disposant plus de 4 épitopes dans leurs séquences ont été considérées comme éligible à la liste de protéines immunodominantes du sécrétome de *T. congolense* IL3000 et potentiellement candidates au diagnostic sérologique de *T.*

congolense.

8.2.2.5 Immublotting sur sécrétome

Le protocole d'immunoblotting est décrit dans la sous-sous-section 5.2.3.4. Brièvement, 250 μ L de sécrétome préparé ont été déposés sur un gel de polyacrylamide de 10% dans un même puit et les protéines ont été séparées à 200 V pendant 30-45 minutes. Par la suite, les protéines ont été transférées sur une membrane de polyvinylidène grâce au système de transfert Trans-Blot® Turbo™ de Bio-Rad en 7 minutes. La membrane a été découpée en plusieurs bandelettes et chacune d'elles a été saturée avec le tampon de blocage (PBS 1x, 0,1% de Tween-20, 5% de lait écrémé) pendant 2 h à température ambiante (RT). Chaque échantillon de sérum dilué au 1/200 dans le tampon de blocage a été incubé avec une bandelette pendant 1 h à RT. Après lavage, la bandelette a été incubée pendant 1 h avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase. Après une seconde étape de lavage, la réaction a été révélée par chimioluminescence à l'aide du substrat Pierce™ ECL et les images ont été acquises à l'ImageQuant™ LAS 4000.

8.2.2.6 Représentations graphiques et analyse statistique

Les graphiques ont été établis en utilisant le logiciel Excel 2016, Graph Pad Prism 5 et le logiciel R version 4.0.3. Les intensités des bandes détectées par l'expérience d'immunoblotting ont été quantifiées via le logiciel ImageJ version 1.52k. La valeur du niveau de gris soustraite du bruit de fond a été déterminée pour chaque bande et la carte thermique (heatmap) a été établie avec R.

L'analyse de composantes principales (ACP) a été réalisée sur les valeurs d'intensité obtenues par la quantification sur ImageJ. L'ACP centrée non réduite (afin que les protéines les plus reconnues en immunoblot est plus de poids que les autres) a été utilisée pour identifier une variabilité particulière entre individus ou entre races de bovins à l'aide du logiciel R.

8.3 Résultats

8.3.1 Qualité de la préparation de sécrétome de *T. congolense* IL3000

Pour s'assurer de l'intégrité des parasites au cours de leur incubation dans le milieu de sécrétion, une observation microscopique a été effectuée. En comptant le nombre de parasites qui présentaient une morphologie normale et une bonne motilité, nous avons trouvé un ratio (nombre de parasites départ/nombre de parasites intacts après sécrétion) de 0,94. Ce ratio montre que 94% de parasites étaient intacts après l'incubation dans le milieu de sécrétion. En outre, nous avons fait migrer sur gel de polyacrylamide le sécrétome préparé et un extrait total de *T. congolense* IL3000 (Figure 8.1). Sur ce gel, les deux échantillons de la préparation concentrée du sécrétome montrent des profils identiques et très distincts de ceux du lysat total. La taille des protéines présentes varie de 15 à 90 kDa avec une bande des protéines très abondante à 90 kDa (Figure 8.1).

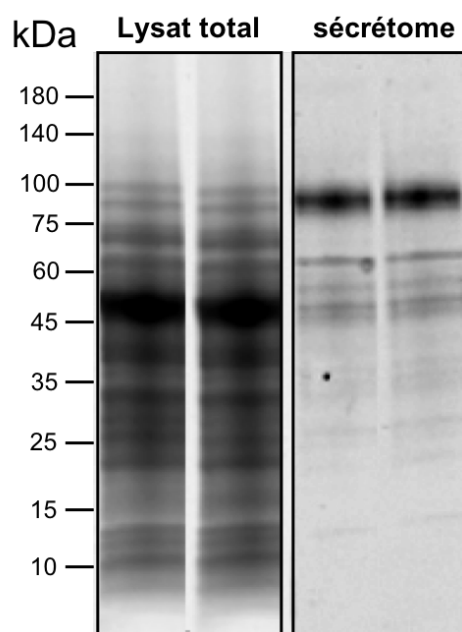


FIGURE 8.1 – Profil du sécrétome de *T. congolense* IL3000 en comparaison avec le lysat total. Gel SDS-PAGE avec coloration Coomassie montrant les protéines du sécrétome (10 μ L déposé) et le protéome total (5×10^6 trypanosomes dans 10 μ L). KDa (KiloDalton) : représente le marqueur de poids moléculaire.

8.3.2 Caractérisation de protéines du sécrétome

8.3.2.1 Identification et ontologie génique de protéines du sécrétome

Pour identifier les protéines sécrétées ou excrétées par *T. congolense* dans une culture *in vitro*, nous avons réalisé une analyse protéomique sur trois échantillons de sécrétome préparés en parallèle. Grâce à une expérience de LC-MS/MS précédée d'une digestion trypsique, nous avons détecté jusqu'à 1429 protéines, soit 12% du protéome total de *T. congolense* IL3000. Les protéines ont été détectées avec un nombre de peptides uniques variant de 2 à 78 et une masse moléculaire comprise entre 10 à 532 kDa. Parmi ces protéines, 97 étaient retrouvées uniquement dans un seul échantillon, 136 protéines dans deux des échantillons et enfin 1196 protéines dans les trois échantillons analysés (Figure 8.3A). Ces dernières ont été celles considérées pour la suite dans notre analyse.

L'analyse de fonction de ces protéines par l'enrichissement de l'ontologie génique a montré que 82,87% (soit 992 protéines) ont une fonction moléculaire, métabolique ou cellulaire connue et/ou putative. Le reste des protéines, 17,13% (205 protéines), était de fonction inconnue (Figure 8.2A). Afin de minimiser le bruit de fond de cette analyse, l'enrichissement a été limité aux termes se trouvant dans des sous-ensembles génériques, eux mêmes se trouvant dans les trois grandes catégories fonctionnelles à savoir : la catégorie composante cellulaire, la fonction moléculaire, l'implication dans un processus métabolique (Figure 8.2B-C-D). Les protéines détectées dans la catégorie composante cellulaire, étaient essentiellement cytoplasmique (33%), organellaire (29%), nucléaire (14%) ou rentrant dans la composition des complexes protéiques (11%). Plus de 50% de protéines identifiées avaient une fonction biologique avec 14% pour la seule fonction de liaison ionique (ion binding). D'un point de vue métabolique, les protéines détectées étaient majoritairement impliquées dans la traduction (19%), le métabolisme des petites molécules (25%) et dans le processus catabolique (16%).

8.3.2.2 Identification de protéines immunogéniques putatives

En 1993, Authié *et al.*, ont montré que la plupart de protéines immunoréactives d'un lysat total de *T. congolense* était détectée à un poids moléculaire variant de 20 à 70 kDa (Authié *et al.*, 1993). Considérant cette observation, 837 protéines ont été sélection-

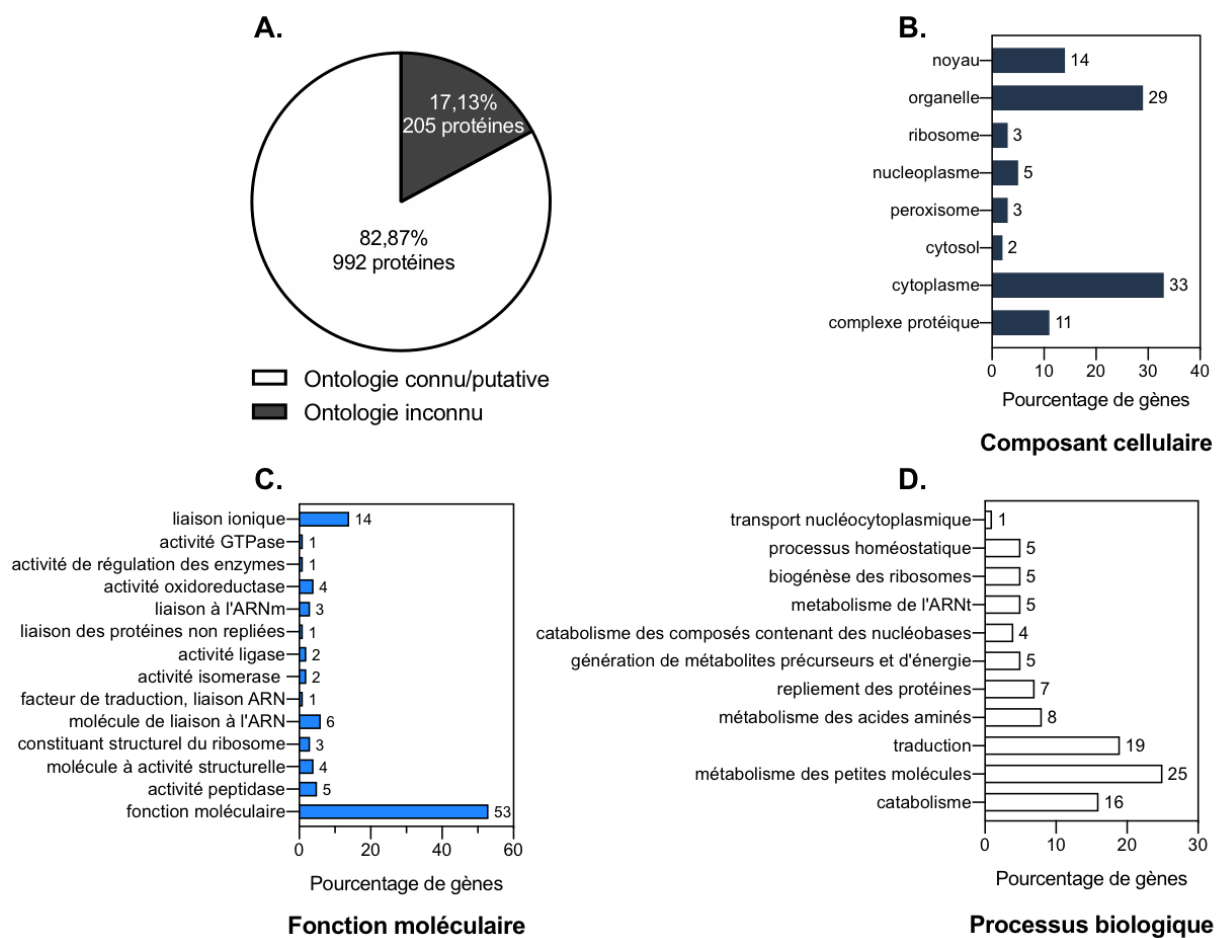


FIGURE 8.2 – Classification en catégories fonctionnelles des protéines identifiées dans le sécrétome de *T. congolense* IL3000. Les protéines ont été catégorisées directement sur le site TriTrypDB. La somme des pourcentages de protéines des trois grandes catégories dépassent 100% car un même gène peut appartenir aux trois catégories fonctionnelles à la fois.

nées (70%) avec un poids moléculaire se situant dans cet intervalle de tailles (Figure 8.3A-B). Pour identifier des protéines pouvant potentiellement constituer des biomarqueurs au diagnostic sérologique de *T. congolense*, la stratégie de tri de données, présentée dans la Figure 8.3A a été adoptée. Dans un premier temps, nous avons soustrait les glycoprotéines variantes de surface (67 VSG détectées) et l'analyse de prédiction d'épitopes potentiels (cibles des anticorps de lymphocytes B) a été réalisée sur les 770 protéines retenues en considérant un seuil de 0,6 supérieur au seuil optimal défini sur la base de données IEDB (Immune Epitope Database). Nous avons identifié 97 protéines (12,56%) qui ne présentaient aucun épitope linéaire sur leur séquence (Figure 8.3C). Le nombre d'épitopes prédits par protéine était compris entre 1 et 12 épitopes. Parmi les protéines qui présentaient un épitope ou plus, 533 protéines (69%) ont montré moins de 5 épitopes. Les protéines les plus immunogéniques putativement (142 protéines) possédaient dans leur séquence 5 épitopes ou plus et représentaient moins de 20% des protéines soumises à cette analyse immuno-informatique (Tableau 8.1, Figure 8.3C). Parmi ces protéines immunogéniques, neuf présentaient entre 9 et 12 épitopes, du même ordre que le nombre d'épitopes prédit pour certaines VSG. C'est notamment le cas des trois protéines hypothétiques conservées (TcIL3000_10_3290.1, TcIL3000_10_10720.1 et TcIL3000_1_200.1) qui ont été détectées avec 9, 10 et 12 épitopes respectivement; une mannosidase (TcIL3000_8_2830.1) avec 9 épitopes et trois protéines ribosomales avec 10 (TcIL3000.11.2170.1, TcIL3000.11.2830.1) et 11 épitopes (TcIL3000_4_1450.1). Comme attendu, une glycoprotéine invariante de surface (TcIL3000_0_35560.1) avec 10 épitopes a également été détectée (Tableau 8.1).

8.3.3 Réactivité des sérums de différentes races de bovins aux protéines immunoréactives du sécrétome

Pour affiner notre analyse et montrer expérimentalement l'immunoréactivité de protéines du sécrétome de *T. congolense*, nous avons testé une centaine d'échantillons de sérums provenant de quatre races bovines différentes, infectées expérimentalement par *T. congolense* IL1180, sur le sécrétome de *T. congolense* IL3000. Pour chaque individu, un sérum pré-immun, trois sérums prélevés entre 20 et 33 jours après infection et un sérum tardif prélevé deux mois après l'infection ont été testés par western blot sur bandelettes (immunoblotting). La Figure 8.4 montre la réactivité de chaque

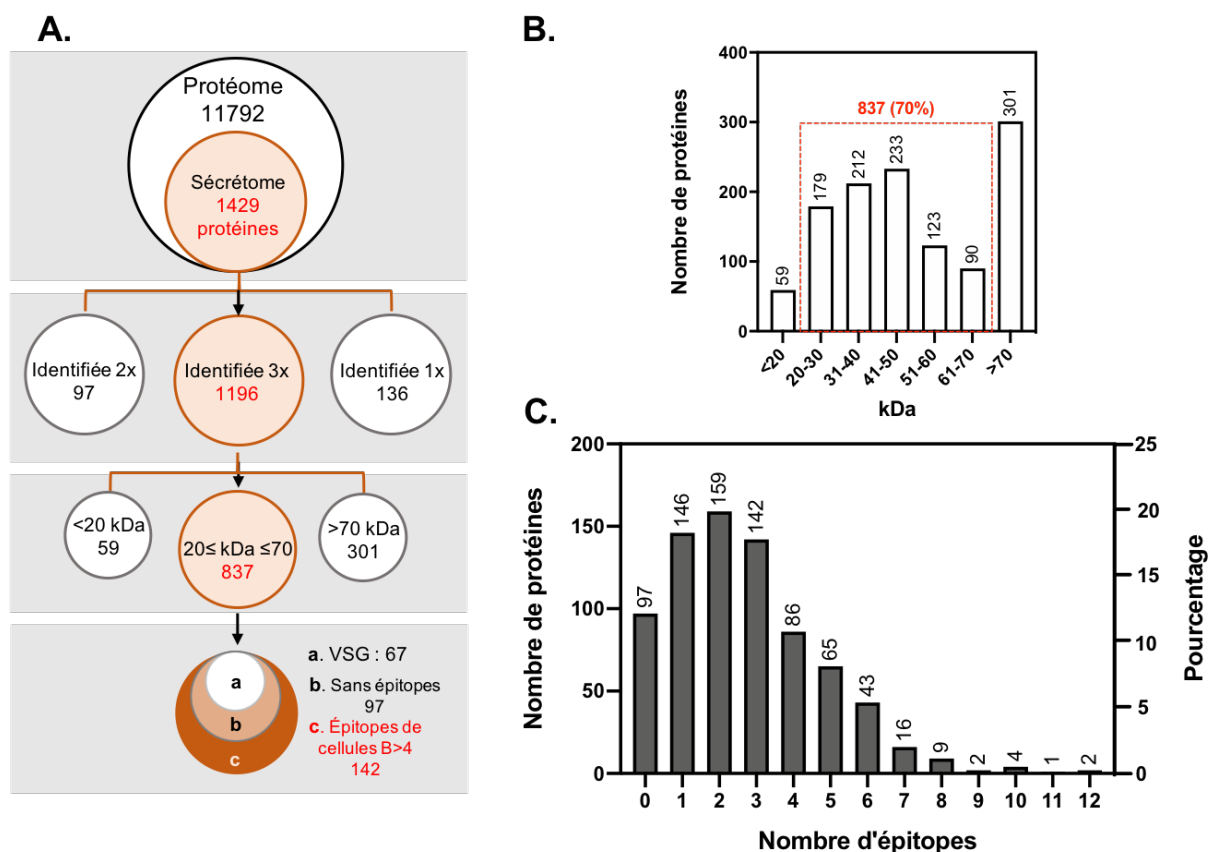


FIGURE 8.3 – Identification des protéines immunogéniques putatives de *T. congolense* IL3000 comme biomarqueurs pour le diagnostic. **A.** Stratégie de sélection des protéines immunogéniques du sécrétome. **B.** Nombre de protéines identifiées en fonction du poids moléculaire. **C.** Prédiction d'épitopes sur les protéines de 20 à 70 kDa et pourcentage de protéines par nombre d'épitopes prédits. La stratégie : les protéines détectées au moins 3 fois par spectrométrie de masse ont été classées en fonction de leur taille. Sur les protéines de taille comprise entre 20 et 70 kDa, une analyse de prédiction d'épitopes a été réalisée au seuil de 0,6 avec des peptides de taille comprise entre 5 et 30 acides aminés comme éligibles avec l'algorithme Bepipred 2.0.

TABLE 8.1 – Protéines identifiées avec plus de quatre épitopes dans leurs séquences.

Accession	Description	Peptides				
		Peptides	Uniques	AA	kDa	Epitopes
TcIL3000_0_57520.1	kinetoplastid-specific phospho-protein phosphatase, putative	5	5	627	69	12
TcIL3000_1_200.1	hypothetical protein, conserved	3	3	616	66	12
TcIL3000_4_1450.1	ribosomal protein L3, putative	21	21	429	49	11
TcIL3000_0_35560.1	invariant surface glycoprotein, putative	9	9	542	60	10
TcIL3000.11.2170.1	mRNA export factor MEX67	7	7	574	62	10
TcIL3000_10_10720.1	hypothetical protein, conserved (fragment)	8	8	589	64	10
TcIL3000.11.2830.1	ribosome assembly protein RRB1, putative	2	2	569	64	10
TcIL3000_10_3290.1	hypothetical protein, conserved	6	6	508	56	9
TcIL3000_8_2830.1	mannosyl-oligosaccharide 1,2-alpha-mannosidase IB, putative	5	5	598	66	9
TcIL3000_10_210.1	protein kinase, putative	18	18	508	58	8
TcIL3000_0_42210.1	invariant surface glycoprotein, putative	13	4	423	46	8
TcIL3000_0_17210.1	invariant surface glycoprotein, putative	12	12	385	43	8
TcIL3000_4_3390.1	nucleolar protein, putative	7	7	568	63	8
TcIL3000_0_12460.1	65 kDa invariant surface glycoprotein, putative	3	3	419	46	8
TcIL3000_1_1340.1	exosome-associated protein 1, putative	4	4	391	42	8
TcIL3000.11.8800.1	carbonic anhydrase-like protein	2	2	414	45	8
TcIL3000_0_29070.1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	3	3	468	52	8
TcIL3000_0_22870.1	histone deacetylase 4	3	3	588	65	8
TcIL3000_3_2100.1	serine/threonine-protein kinase, putative	18	18	502	56	7
TcIL3000_0_22080.1	invariant surface glycoprotein, putative	13	5	428	47	7
TcIL3000.11.15300.1	bilobe region protein, putative	5	5	354	39	7
TcIL3000.11.14360.1	nuclear RNA binding domain	17	17	270	29	7
TcIL3000_4_770.1	ruvB-like DNA helicase, putative	19	19	459	50	7
TcIL3000_8_1810.1	Golgi/lysosome glycoprotein 1, putative	11	11	615	67	7
TcIL3000_10_11680.1	tubulin cofactor C domain-containing protein RP2, putative	7	7	456	49	7
TcIL3000_3_1550.1	hypothetical protein	10	10	314	35	7
TcIL3000_8_6060.1	Phosphorylated CTD interacting factor 1 WW domain containing protein, putative	6	6	565	63	7
TcIL3000_6_390.1	ccr4-not transcription complex subunit 2	6	6	286	32	7
TcIL3000_0_05260.1	heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU, putative	7	7	478	53	7
TcIL3000_0_44870.1	PFU (PLAA family ubiquitin binding), putative	5	5	555	60	7
TcIL3000_0_19190.1	protein kinase, putative (fragment)	6	6	439	49	7
TcIL3000.11.6810.1	inositol-1,4,5-trisphosphate (IP3) 5-phosphatase, putative	4	4	555	61	7
TcIL3000.11.15310.1	hypothetical protein (fragment)	3	3	230	26	7
TcIL3000.11.4490.1	hypothetical protein, conserved	3	3	518	59	7
TcIL3000_6_3790.1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit d	15	15	493	56	6
TcIL3000_3_3490.1	dynein intermediate chain WDRD34, putative	9	9	532	57	6
TcIL3000_0_58190.1	quiescin sulfhydryl oxidase	8	8	522	59	6
TcIL3000_9_1800.1	actin-like protein 3, putative	7	7	416	47	6
TcIL3000_5_50.1	hypothetical protein, conserved	7	7	365	40	6
TcIL3000_10_1220.1	hypothetical protein, conserved	8	8	245	28	6
TcIL3000_0_11870.1	Transferrin receptor-like, ESAG6-like	17	4	396	43	6
TcIL3000_0_22060.1	invariant surface glycoprotein, putative	20	10	477	50	6
TcIL3000_0_11880.1	Transferrin receptor-like, ESAG6-like	16	14	392	43	6
TcIL3000_0_46780.1	Transferrin receptor-like, ESAG6-like	17	16	396	43	6
TcIL3000_9_3370.1	polyadenylate-binding protein 1, putative	16	16	552	62	6
TcIL3000_0_18890.1	Transferrin receptor-like, PAG-like	17	6	393	44	6
TcIL3000_10_7500.1	CCR4-NOT transcription complex subunit 10, putative	17	17	599	66	6
TcIL3000_8_6540.1	hypothetical protein, conserved	17	17	585	66	6
TcIL3000_0_07710.1	Transferrin receptor-like, ESAG6-like	12	6	398	43	6
TcIL3000.11.10830.1	regulator of chromosome condensation 1-like protein	14	14	625	69	6
TcIL3000_8_5320.1	apurinic/aprimidinic endonuclease, putative	11	11	400	44	6

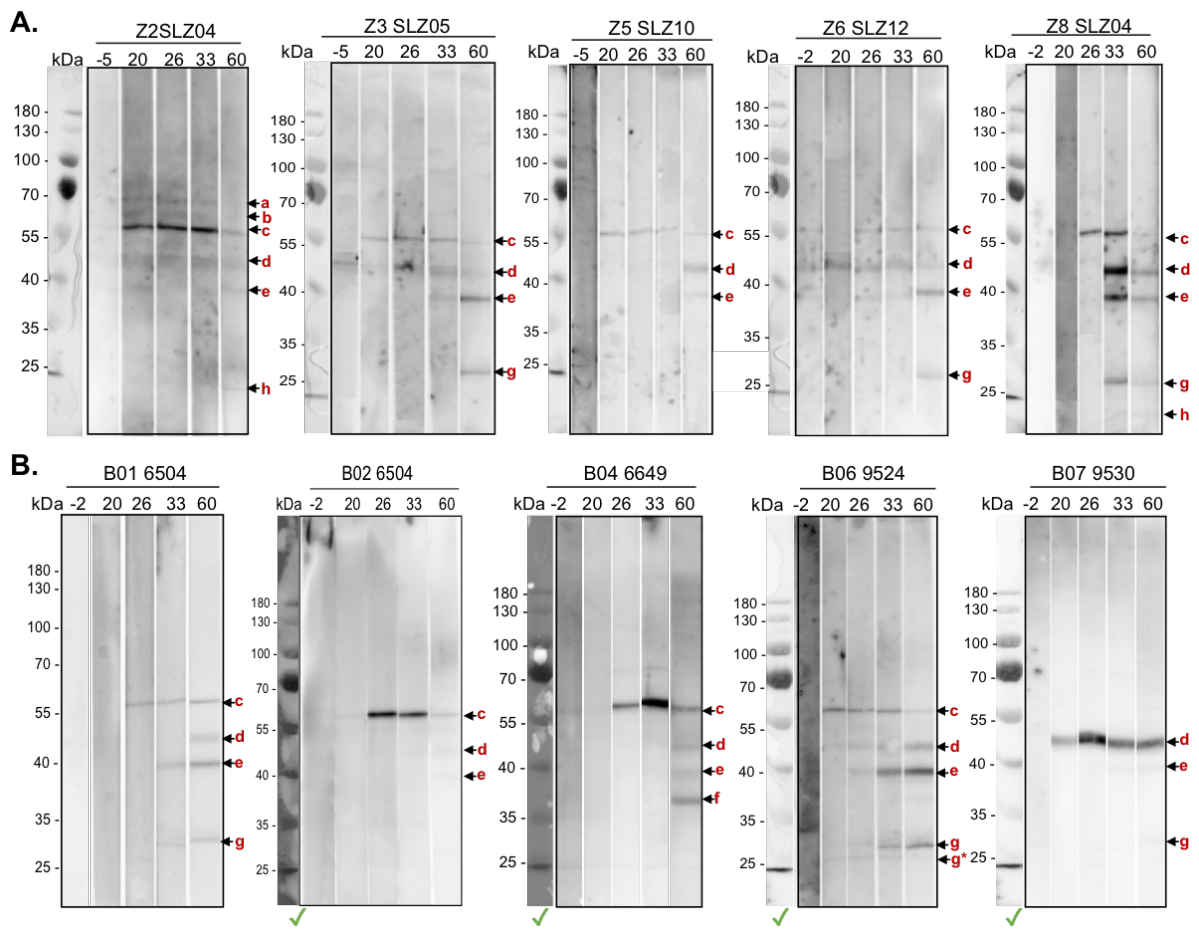
TcIL3000_10_12240.1	Histone chaperone Rtp106-like, putative	10	10	552	61	6
TcIL3000_4_3050.1	Carnosine N-methyltransferase, putative	10	10	437	49	6
TcIL3000_0_26980a.1	hypothetical protein, conserved (fragment)	9	9	394	43	6
TcIL3000_0_06660.1	Calcineurin-like phosphoesterase, putative	8	8	450	50	6
TcIL3000_10_11040.1	predicted zinc finger protein	6	6	324	34	6
TcIL3000_7_4940.1	mercaptopyruvate sulfurtransferase, putative	7	7	376	42	6
TcIL3000_10_7310.1	glucose transporter, putative	3	3	527	57	6
TcIL3000.11.4250.1	mannose-specific lectin, putative	4	4	626	70	6
TcIL3000_10_10140.1	hypothetical protein, conserved	5	5	462	49	6
TcIL3000_3_1020.1	General negative regulator of transcription subunit 5	6	6	623	69	6
TcIL3000.11.9810.1	hypothetical protein	2	2	364	37	6
TcIL3000_10_3350.1	hypothetical protein, conserved	3	3	399	43	6
TcIL3000_0_50900.1	protein kinase, putative	5	2	442	49	6
TcIL3000_0_15990.1	invariant surface glycoprotein, putative	3	3	434	47	6
TcIL3000_9_1010.1	cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	3	3	319	36	6
TcIL3000_0_02600.1	MYND finger containing protein, putative	4	4	507	57	6
TcIL3000_6_2890.1	Domain of unknown function (DUF814), putative	3	3	208	25	6
TcIL3000_0_00060.1	endoplasmic reticulum oxidoreductin, putative	3	3	444	50	6
TcIL3000_10_6020.1	hypothetical protein, conserved	4	4	523	58	6
TcIL3000_8_6140.1	hypothetical protein, conserved	2	2	378	42	6
TcIL3000.11.13730.1	hypothetical protein, conserved	2	2	285	31	6
TcIL3000_0_46210.1	hypothetical protein, conserved	2	2	295	33	6
TcIL3000.11.6250.1	RNA-binding protein 38, putative	2	2	471	52	6
TcIL3000_0_41370.1	Poly(A)-specific ribonuclease PARN-1	2	2	586	66	6
TcIL3000_4_2270.1	Endonuclease/Exonuclease/phosphatase family, putative	3	3	507	56	6
TcIL3000_3_510.1	PRP38 family, putative	2	2	524	59	6
TcIL3000_0_44210.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C1, Cathepsin L-like	13	7	524	57	5
TcIL3000_10_8120.1	L-2-hydroxyglutarate dehydrogenase, mitochondrial, putative	12	12	524	57	5
TcIL3000.11.14330.1	Pab1p-dependent poly(A) ribonuclease subunit, putative	7	7	505	56	5
TcIL3000.11.13530.1	membrane-bound acid phosphatase 2	5	5	496	55	5
TcIL3000_0_14840.1	Transferrin receptor-like, PAG-like	19	19	428	48	5
TcIL3000.11.7660.1	acidocalcisomal pyrophosphatase	15	15	415	48	5
TcIL3000_0_42200.1	invariant surface glycoprotein, putative	15	12	427	46	5
TcIL3000_0_08990.1	SET domain containing protein, putative	15	15	405	45	5
TcIL3000_2_960.1	RNA-binding protein, putative	10	10	407	47	5
TcIL3000_0_17710.1	homocysteine S-methyltransferase, putative	7	7	432	48	5
TcIL3000_5_1580.1	protein phosphatase 2C, putative	5	5	416	45	5
TcIL3000_0_32800.1	hypothetical protein, conserved	5	5	412	46	5
TcIL3000_9_6340.1	60S ribosomal protein L5, putative	10	10	348	39	5
TcIL3000_9_2190.1	inositol-1(or 4)-monophosphatase, putative	11	11	364	40	5
TcIL3000_0_42440.1	60S ribosomal protein L13, putative	11	11	218	25	5
TcIL3000_0_56640.1	60S ribosomal protein L27a	7	7	239	27	5
TcIL3000.11.14520.1	ubiquitin-conjugating enzyme E2, putative	5	5	247	28	5
TcIL3000_10_13150.1	DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1, putative	6	6	258	29	5
TcIL3000_0_56720.1	hypothetical protein, conserved	5	5	240	27	5
TcIL3000_4_700.1	V-type ATPase, A subunit, putative	33	33	610	68	5
TcIL3000_0_29570.1	glucose-6-phosphate isomerase, glycosomal	26	26	607	68	5
TcIL3000_0_28270.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C1, Cathepsin L-like	18	5	447	48	5
TcIL3000_0_11910.1	Transferrin receptor-like, ESAG6-like	23	22	391	43	5
TcIL3000_0_17860.1	cysteine peptidase, Clan CA, family C1, Cathepsin L-like	13	3	445	48	5
TcIL3000_9_4350.1	polyadenylate-binding protein 2	23	23	557	62	5
TcIL3000_0_38630.1	hypothetical protein	20	20	411	45	5
TcIL3000_0_42190.1	invariant surface glycoprotein, putative	16	6	516	55	5

TcIL3000_7_3730.1	PX domain containing protein, putative (fragment)	12	12	365	40	5
TcIL3000.11.13540.1	Present in the outer mitochondrial membrane proteome 10	16	16	554	61	5
TcIL3000_0_32170.1	Transferrin receptor-like, PAG-like	15	2	421	48	5
TcIL3000_7_580.1	protein kinase C substrate protein, heavy chain, putative	19	19	477	54	5
TcIL3000_8_7190.1	serine/threonine-protein kinase a, putative	13	13	440	50	5
TcIL3000.11.1490.1	guide RNA-binding protein of 21 kDa	9	9	207	24	5
TcIL3000_9_1940.1	nucleosome assembly protein-like protein, putative	9	9	420	48	5
TcIL3000_10_5840.1	vacuolar protein sorting-associated protein 45, putative	10	10	588	65	5
TcIL3000_8_2880.1	hypothetical protein, conserved	8	8	300	34	5
TcIL3000_0_22360.1	NADH-dependent fumarate reductase	9	5	451	49	5
TcIL3000_6_1750.1	pdz domain containing protein, putative (fragment)	9	9	608	67	5
TcIL3000_0_34540.1	phosphoinositide-binding protein, putative (fragment)	7	7	303	35	5
TcIL3000_0_37860.1	rac serine-threonine kinase, putative	4	4	457	52	5
TcIL3000_9_270.1	Lys-63-specific deubiquitinase BRCC36, putative	6	6	395	44	5
TcIL3000.11.11480.1	Casein kinase II subunit beta, putative	4	4	292	33	5
TcIL3000_4_1510.1	hypothetical protein, conserved	6	6	579	65	5
TcIL3000.11.8250.1	Major Surface Protease	6	6	572	63	5
TcIL3000_10_6650.1	ubiquitin fusion degradation protein, putative	6	6	316	35	5
TcIL3000_8_310.1	nucleolar RNA-binding protein, putative	3	3	325	34	5
TcIL3000_0_04870.1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	4	4	328	36	5
TcIL3000_3_3060.1	Ankyrin repeats (many copies)/Ankyrin repeats (3 copies), putative	5	5	355	40	5
TcIL3000_10_8610.1	Regulatory particle triple-A ATPase subunit 6	6	6	400	45	5
TcIL3000_6_3190.1	zinc finger of C3HC4-type, RING/B-box zinc finger, putative	4	4	565	63	5
TcIL3000_0_54640.1	cyclophilin-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	4	4	225	25	5
TcIL3000_7_1830.1	proteasome regulatory ATPase subunit 1	4	4	437	49	5
TcIL3000_3_2470.1	hypothetical protein, conserved	5	5	393	43	5
TcIL3000_0_47810.1	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase, putative	5	5	555	63	5
TcIL3000_0_50910.1	Intraflagellar transport complex B protein 46 C terminal, putative	3	3	392	45	5
TcIL3000_3_500.1	hypothetical protein, conserved	3	3	199	22	5
TcIL3000_7_1640.1	DNA primase small subunit, putative	4	4	417	47	5
TcIL3000_6_3700.1	hypothetical protein, conserved	2	2	327	35	5
TcIL3000_6_1060.1	hypothetical protein, conserved	4	4	573	65	5
TcIL3000_5_2920.1	mitochondrial DNA polymerase beta, putative	2	2	408	46	5
TcIL3000_0_37510.1	hypothetical protein, conserved	2	2	577	63	5
TcIL3000_0_38460.1	hypothetical protein, conserved	2	2	233	26	5
TcIL3000_0_52490.1	Vta1 like, putative	2	2	340	37	5
TcIL3000.11.9950.1	tubulin binding cofactor c, putative	3	3	307	34	5
TcIL3000_3_1480.1	AGC essential kinase 1	2	2	408	46	5

échantillon testé individuellement. Au total, onze tailles moléculaires différentes annotées de (a) à (h) ont été détectées. Une réponse hétérogène entre individus et races a été observée. Cependant, des protéines immunoréactives à quatre tailles moléculaires majeures ont été retrouvées chez toutes les races avec un effet temporel. Il s'agit des bandes à 58, 47, 39 et 27 kDa dont les intensités sont représentées sur la carte thermique (Figure 8.5). La bande à 58 kDa est détectée très précocement chez toutes races dès 20 jours après infection (DPI) et son intensité diminue fortement après deux mois d'infection (Figures 8.4, 8.5). À l'inverse, les bandes de 27 et de 39 kDa sont détectées plus tardivement avec une forte réactivité à 60 DPI chez les quatre races. En excluant la bande à 51 ± 4 kDa se trouvant dans la zone de détection de la VSG, plusieurs protéines présentant des épitopes dans leurs séquences peuvent correspondre aux bandes détectées (Tableau 8.1). Citons par exemple la cystéine peptidase L-like (TcIL3000_0_44210.1, 5 épitopes) ou la protéine hypothétique conservée (TcIL3000.11.4490.1, 7 épitopes) pour la bande de 58 kDa ; la protéine hypothétique conservée (TcIL 3000_5_50.1, 6 épitopes) pour la bande de 39 kDa ou la protéine L13 ribosomale 60S (TcIL3000_0_42440.1, 5 épitopes) pour la bande de 27 kDa. L'ACP n'a montré aucune différence notable entre race (Figure 8.6).

8.4 Discussion et Perspectives

L'élaboration d'outils de diagnostic adéquats pour la trypanosomose animale africaine est une priorité car ces outils sont indispensables à la mise en place des programmes de surveillance et de lutte contre cette maladie. Comme précédemment abordé dans le chapitre 6 et 7, le sérodiagnostic est à l'heure actuelle, la méthode de diagnostic la mieux adaptée aux études épidémiologiques de la TAA. Plusieurs tests ont été proposés. Toutefois, le besoin en nouvelles protéines immunoréactives à utiliser comme antigènes, individuellement ou dans un cocktail pour développer des nouveaux tests ou améliorer les tests existants, reste important. Répondre à cette problématique était l'un des objectifs principaux de cette thèse. Pour ce faire, nous avons réalisé une analyse protéomique sur le sécrétome de *T. congolense* IL3000. À l'aide d'un outil de prédiction d'immunogénicité, une centaine de protéines ont été identifiées avec de tailles comprises entre 20 et 70 kDa et présentant 5 épitopes ou plus dans leurs séquences. L'analyse de la réactivité des sérums provenant de différentes



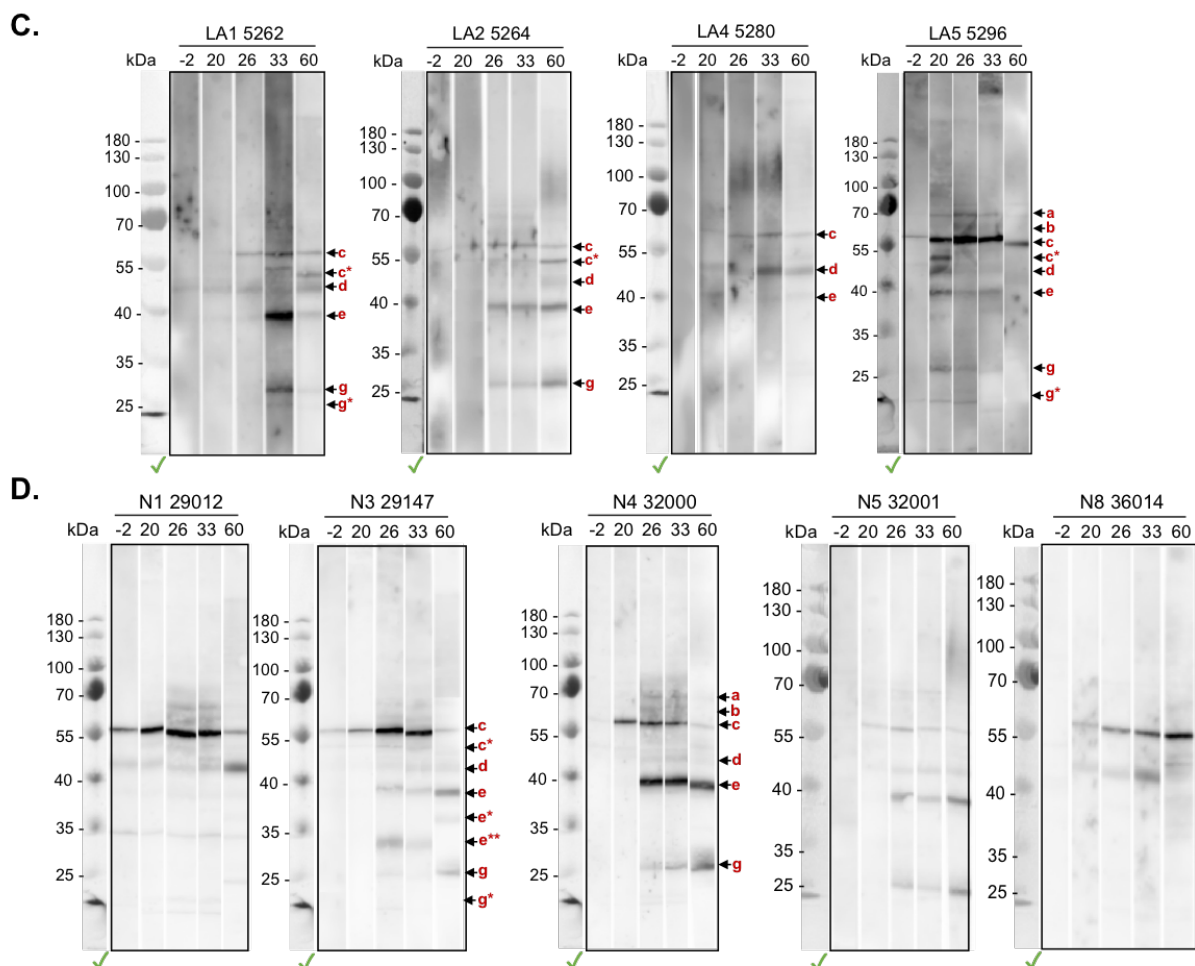


FIGURE 8.4 – Analyse par immunoblotting du profil des réponses anticorps des races bovines au sécrétome de *T. congolense*. A. Zebu felani (5 animaux) ; B. Bourguou (5 animaux) ; C. Lagunaire (4 animaux) et D. N'Dama (5 animaux). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane PVDF. La membrane a été coupée en bandelettes qui ont été incubées pour chaque animal avec un sérum naïf (-2), des sérums prélevés à la phase aiguë (20, 26), un sérum au pic d'anticorps de bovin (33) et un sérum tardif (60). Les bandes détectées sont annotées de a à h avec e*=f et g=h. Le marqueur de tailles moléculaires (kDa) se trouve à gauche.**

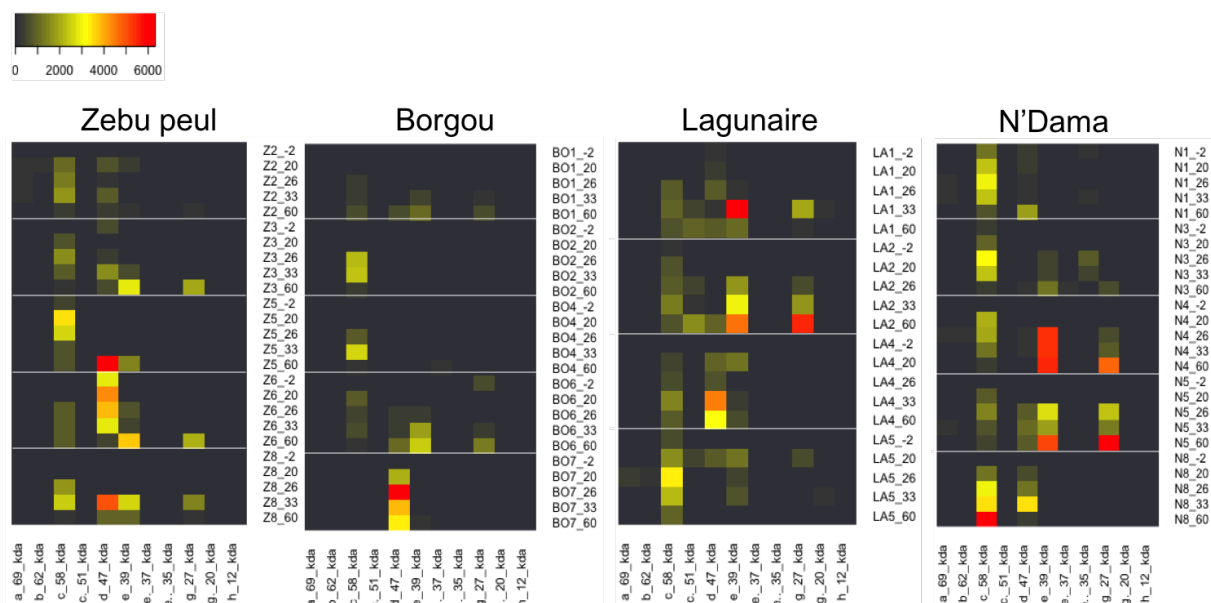


FIGURE 8.5 – Niveaux de réactivité des sérums de bovins aux protéines du sécrétome de *T. congolense* IL3000 en carte thermique. L'intensité des bandes détectées en immunoblotting a été quantifiée par le logiciel de traitement d'image : ImageJ. Les niveaux de gris des bandes pour chaque animal et pour chaque race ont été présentés dans une carte thermique sur R. L'intensité augmente du noir vers le rouge.

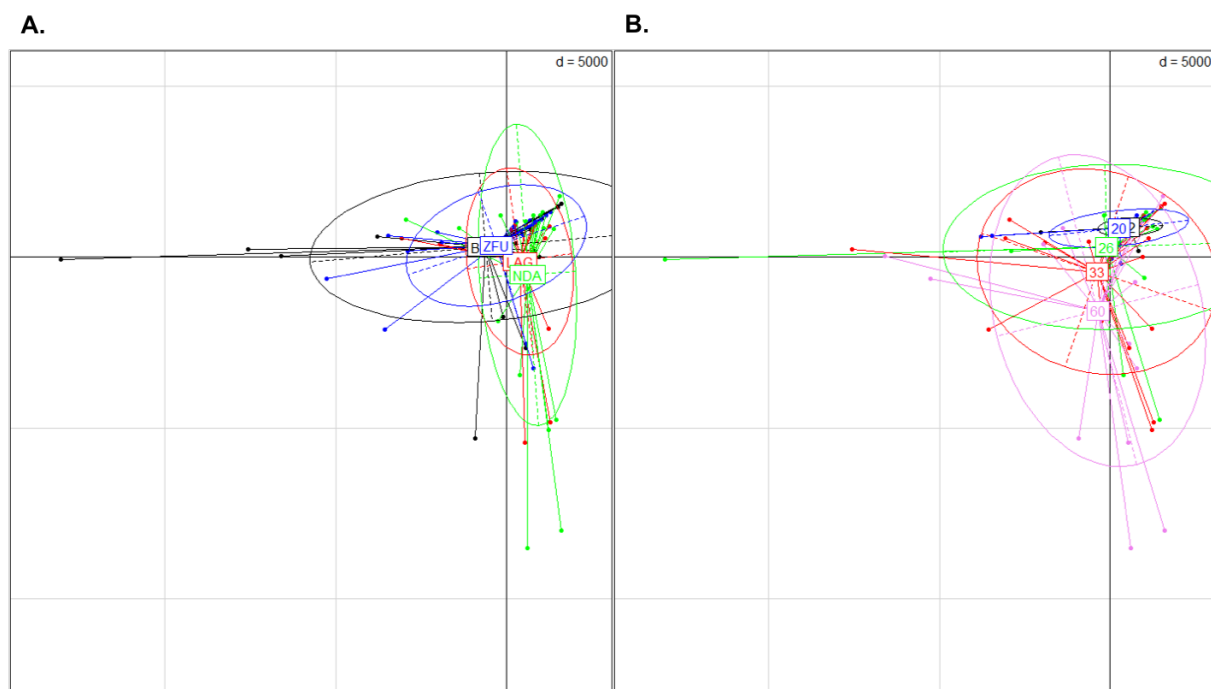


FIGURE 8.6 – Analyse des composantes principales des intensités des bandes de l'immunoblotting. **A.** ACP centrée non réduite basée sur la réactivité globale de chaque race ; **B.** ACP centrée non réduite basée sur le temps de prélèvement post-infection de sérums.

rares bovines infectées par *T. congolense* IL1180 a permis de détecter des protéines à quatre tailles moléculaires majeures (58, 47, 39 et 27 kDa). À ces tailles correspond un grand nombre des protéines caractérisées *in silico* comme immunogéniques. Ces résultats fournissent une base importante pour guider le choix des nouvelles protéines à évaluer en sérodiagnostic de la TAA.

Les méthodes d'identification de protéines immunoréactives de trypanosomes sont diverses et présentent des avantages différents en fonction de la technologie employée (voir chapitre 3). Dans la littérature, quelques études basées sur l'analyse protéomique ont été réalisées sur le sécrétome de différentes espèces et souches de trypanosomes. Elles visaient notamment à identifier et caractériser à partir d'une analyse de masse, les facteurs pathogéniques sécrétés activement par les trypanosomes (Geiger et al., 2010, Grebaut et al., 2009, Holzmüller et al., 2008). Dans la présente étude, nous avons employé à la fois la spectrométrie de masse, l'immuno-informatique et l'immunodétection pour caractériser les protéines immunoréactives du sécrétome de *T. congolense*. La préparation du sécrétome est une étape cruciale pour l'analyse de sa composition. Ainsi, nous avons utilisé un protocole optimisé pour avoir une préparation enrichie en protéines sécrétées et excrétées de *T. congolense* en limitant le risque de contamination par les protéines non sécrétés. Le protocole utilisé dans les études précédemment évoquées consistait à incuber un nombre important de parasites 2×10^8 /mL pendant 2 h dans un milieu initialement conçu pour *T. brucei*. Nous avons opté pour une incubation plus longue avec deux fois moins de parasites et quatre fois plus de milieu pour se rapprocher le plus près possible de conditions naturelles d'infection chez l'hôte mammifère. Le profil obtenu en SDS-PAGE est typique du sécrétome de *T. congolense* IL3000. Les protéines détectées avaient entre 15 et 100 kDa comme observé par Grébaut et al. (2009) en 2D SDS-PAGE (Grebaut et al., 2009).

L'analyse protéomique a permis d'identifier un nombre total de 1429 protéines avec 1196 protéines détectées dans les trois échantillons préparés et analysés en parallèle. Ce nombre dépasse largement le nombre record de protéines identifiées dans le sécrétome de trypanosomes, précédemment signalé dans les études antérieures (Geiger et al., 2010). Ceci pourrait s'expliquer notamment par la durée de l'incubation de parasites lors de la préparation du sécrétome. La période d'incubation aurait favorisé

à la fois la sécrétion de protéines habituellement décrites mais également le réarrangement d'autres protéines (pour éviter leur accumulation) dans ces conditions de stress important. Un grand nombre de ces protéines avait une localisation et une fonction cytoplasmique et organellaire. Ceci serait éventuellement dû à un stress trop important responsable de la mort d'un certain nombre de parasites. La spectrométrie de masse étant très sensible, la libération d'une petite quantité de protéines du cytoplasme ou des organites suffirait pour avoir une préparation de sécrétome contaminée. Toutefois, en confrontant nos résultats avec les données de la littérature, nous avons remarqué qu'il est assez courant que de telles protéines se retrouvent dans le sécrétome non seulement chez les trypanosomes (Grebaut et al., 2009) mais également chez d'autres trypanosomatides comme *Leishmania* (Silverman et al., 2008). En effet, il semblerait que la sécrétion de protéines de *T. congolense* s'effectue essentiellement par la voie non classique proche de celle des bactéries et que seul un petit nombre de protéines du sécrétome possèdent un peptide signal (Grebaut et al., 2009). Nous avons également noté cette faible proportion des protéines à signal de sécrétion. Seulement 190 protéines ont présenté un peptide signal lors de l'analyse de nos données sur la base de données TritypDB.

Les objectifs spécifiques de notre étude étaient d'une part d'identifier les protéines immunoréactives putatives par une analyse immuno-informatique et d'autre part évaluer la réponse anticorps de différentes races bovines contre ces protéines du sécrétome. Constituant l'une des plus exhaustives analyses réalisées sur le sécrétome de *T. congolense*, l'analyse immuno-informatique a permis d'identifier pas moins de 140 protéines qui possédaient 5 épitopes ou plus dans leurs séquences. Ces résultats constituent une importante base de données pour la sélection de nouvelles protéines candidates pour l'immuno-diagnostic. Grâce à cette analyse, nous avons pu retrouver la majorité des protéines immunodominantes (sécrétées) évaluées en diagnostic et/ou dans la stratégie vaccinale. Citons : les cathépsines L-like (Cortez et al., 2009, Eyssen et al., 2018, Ortiz et al., 2009), plusieurs glycoprotéines invariantes de surface (Fleming et al., 2014, Ziegelbauer and Overath, 1992), la tubuline (Lubega et al., 2002). Par ailleurs, les immunoblots issus du test des sérums des bovins sur la préparation de sécrétome a permis de détecter plusieurs protéines entre 20 et 70 kDa. Ce résultat confirme l'analyse de prédiction d'épitopes et suggèrent indéniablement la présence

de plusieurs protéines immunoréactives. Mise à part la différence au niveau des tailles de bandes détectées, ce résultat est également en accord avec l'étude d'Authié *et al.* (1993), qui ont montré l'immunoréactivité d'un grand nombre de protéines de taille comprise entre 20 et 70 kDa du lysat total de *T. congolense* (Authié *et al.*, 1993). En outre, quoique l'ACP ne montre pas de différences notables entre les races, mais plutôt une évolution temporelle de la réponse sérologique, il semble, selon les heatmaps, que les bovins de races N'Dama et Lagunaire répondent à une plus grande diversité d'antigènes que les Zébus et les Borgous. Ceci encourage l'exploration de la différence entre bovins trypanotolérants et trypanosusceptibles au travers de la réponse immunitaire humorale spécifique au sécrétome.

Les différentes limitations de cette étude sont : 1-/ l'absence d'un test de viabilité cellulaire pour s'assurer plus précisément de la qualité de la préparation de sécrétome. Même si la répétition de l'expérience accorde de la confiance, cela ne remplace pas les données du test d'apoptose. Toutefois, nous avons recherché dans la liste des protéines identifiées par la spectrométrie de masse des marqueurs de la lyse cellulaire ou organellaire comme l'enolase, aldolase et la protéine BiP (immunoglobulin binding protein). La BiP a été le marqueur utilisé par Grébaut *et al.* (2009) et son absence permettait d'apprécier l'intégrité de parasites au cours de l'incubation (Grébaut *et al.*, 2009). Nous n'avons détecté aucune de ces protéines parmi les 1429 protéines détectées, ce qui suggère fortement que les parasites sont restés intacts lors de l'incubation. 2-/ nous n'avons pas analysé le lysat total en protéomique. Cela aurait pu aider à déterminer le degré d'enrichissement de chaque protéine détectée dans le sécrétome. Ainsi, les protéines les plus abondantes pourront être sélectionnées et ciblées pour les tests de détection d'antigènes. C'est une expérience complémentaire et très informative à envisager.

IV |> Conclusion et perspectives

Conclusion générale

La trypanosomiase (pour l'Homme) et la trypanosomose (pour l'animal) sont des maladies qui affectent respectivement les humains et les animaux, domestiques et sauvages. La trypanosomiase humaine africaine ou maladie du sommeil compte actuellement moins de 1000 cas en Afrique et est limitée à quelques foyers épidémiques (OMS, 2020). Très récemment, deux pays Ouest africains, en l'occurrence le Togo et la Côte d'Ivoire, ont reçu la validation de l'OMS sur l'élimination de cette maladie comme problème de santé publique (OMS, 2020, 2021). Cette validation a été obtenue car moins d'un cas par 10 000 habitants a été noté dans ces pays pendant au moins cinq ans. Cette élimination a été atteinte grâce à la forte réduction de nombre de cas dans les foyers endémiques par des mesures robustes de contrôle et de surveillance, au dépistage actif (et passif) des populations à risque et à la lutte anti-vectorielle (OMS, 2021). Plusieurs autres pays africains ont entamé le processus pour obtenir cette validation. Citons : Le Bénin, le Burkina Faso, le Cameroun et le Ghana. Ainsi l'objectif de l'OMS qui est d'éradiquer la maladie du sommeil reste un objectif à porter de main si les efforts se poursuivent dans cette voie. De l'autre côté, si la lutte anti-vectorielle participe également à l'élimination de la trypanosomose animale africaine au travers du programme PATTEC, les stratégies de contrôle et de surveillance qui dépendent d'un diagnostic actif (et passif) rencontrent quelques difficultés (revu dans Büscher et al., 2019, Desquesnes and Dávila, 2002, Ijagbone et al., 1989). Premièrement, un programme de dépistage harmonisé semble absent. En second lieu les outils de diagnostic adaptés aux études épidémiologiques sont peu ou pas accessibles (Peeling and Mabey, 2014).

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse était d'étudier et d'identifier des nouveaux candidats de diagnostic en particulier le diagnostic séro-immunologique de la TAA. Dans la première étude de cette thèse, nous avons montré que l'utilisation combinée de la bio-informatique et de test immuno-enzymatique permet de caractéri-

ser nettement le potentiel diagnostique des protéines recombinantes en sérodiagnostic. Le test individuel de protéines a certes montré un potentiel insuffisant, mais nous avons pu prouver que la combinaison des protéines (d'immunoréactivité proche) sous forme de cocktail d'antigènes présente une meilleure performance diagnostique et permet d'augmenter significativement la sensibilité du test immuno-enzymatique. Les combinaisons testées permettaient de distinguer significativement les sérums positifs des sérums naïfs (ou négatifs). Ensuite, nous avons montré dans la seconde étude que l'association de protéines d'immunoréactivités très différentes n'a pas d'effet positif en sérodiagnostic quand bien même que la spécificité des tests ait été maintenue élevée. Ces données font donc de cette approche de combinaison une stratégie à adopter pour le développement des nouveaux outils de diagnostic pour la TAA avec une combinaison judicieuse des antigènes utilisés. Une telle stratégie permettra de développer un test pan-trypanosomes pour détecter toutes les espèces impliquées dans la TAA ou un test espèce-spécifique en fonction des protéines qui seront combinées. Pour atteindre un tel objectif, il faut disposer d'un large choix de protéines immunoréactives. Dans ce sens, nous avons réalisé une analyse protéomique au travers de laquelle nous avons identifié jusqu'à 142 nouvelles protéines sécrétées/excrétées d'immunogénicité putative élevée. Les protéines identifiées présentaient toutes cinq épitopes ou plus dans leurs séquences. Ces protéines pourraient être testées pour le développement des dits tests.

In fine, la synthèse des peptides englobant les épitopes les plus immunodominants ou encore des chimères de plusieurs de ces protéines pourraient être employée, ce qui permettrait à la fois de pallier le problème de standardisation et d'améliorer nettement la sensibilité et la spécificité des tests à développer.

Les difficultés ayant constituées des points limitants pour les différentes études menées au cours de cette thèse sont entre autres : 1-/ la faible disponibilité de sérums expérimentaux (absence d'animaux infectés par *T. vivax* et un nombre très limité d'échantillons positifs à *T. brucei brucei*), 2-/ absence de sérums de référence de bovins (seulement deux échantillons) et de petits ruminants, et 3-/ l'absence totale d'un plateau de culture bactérienne et de purification de protéines recombinantes dans le laboratoire d'accueil en Afrique (le CIRDES). Ajouter à celles là, la difficulté de se

procurer certains réactifs au CIRDES, plusieurs expériences préalablement planifiées dans le cadre de cette thèse n'ont pas pu être réalisées. L'évaluation du potentiel diagnostique des protéines de *T. vivax* et en partie de *T. brucei brucei* est ainsi incomplète d'un point de vue expérimentale. D'autre part, il faut noter que l'infection de bovins est une expérience onéreuse surtout pour certains laboratoires du sud dont le CIRDES qui dépendrait quasiment des financements de collaborations avec les pays du nord. En outre une telle expérience pose des problèmes éthiques non négligeables.

En termes de difficultés techniques, nous avons été confrontés essentiellement à l'absence des réactifs, des consommables et des équipements spécifiques pour la préparation des antigènes recombinants. Le CIRDES est certes un laboratoire de référence en zone d'endémie sur le diagnostic de la TAA, toutefois il ne dispose pas d'expertise sur place pour produire des antigènes recombinants. L'acquisition d'un tel plateau aurait pourtant constituer un élément essentiel à la fois pour renforcer sa reconnaissance en tant que laboratoire de référence et éventuellement pour aider à trouver d'autres partenariats notamment dans le secteur privé.

Perspectives

Plusieurs expériences supplémentaires sont à envisager pour compléter ce travail selon les différents sujets abordés :

Évaluation de protéines pour le sérodiagnostic

Dans la seconde activité de cette thèse, les cathépsines, qui ont été sélectionnées pour leur immunogénicité décrite dans la littérature, n'ont pas pu être purifiées et testées dans les tests de combinaison. Pourtant, elles sont des cibles hautement immunogéniques et spécifiques. En effet, c'est une cathépsine spécifique de *T. congolense* (cathépsine B1) (Mendoza-Palomares et al., 2008) qui a été incluse dans le premier TDR développé pour la TAA (Boulangé et al., 2017). En outre, le potentiel diagnostique d'une cathépsine de la famille des cathépsines de type L (étudier dans notre travail) a été mise en évidence chez *T. vivax* (Eyssen et al., 2018). Ces protéines sont des cibles idéales pour le sérodiagnostic. Ainsi, en complément à notre étude nous proposons la

poursuite de la production de ces protéines dans un système d'expression eucaryote plus précisément avec le système *Pichia pastoris*. Dans ce système, les protéines recombinantes sont essentiellement sécrétées et la *Pichia pastoris*, quant-à-elle, secrète très peu de ses propres protéines (Pillay et al., 2010). En plus des modifications post-traductionnelles devraient pouvoir s'opérer correctement, et ce système permettra de purifier assez facilement ces cathépsines. Ces protéines pourront ensuite être évaluées individuellement et associées entre elles dans un test ELISA dans un premier temps puis dans un test d'immuno-chromatographie en cas de fort potentiel à distinguer un lot de sérums positifs et un lot de sérums négatifs.

Identification de nouvelles protéines cibles pour le diagnostic immunologique

Pour compléter l'analyse protéomique, certaines expériences pourront être envisagées. Premièrement, l'identité de protéines immunoréactives détectées lors de l'immunoblotting doit être confirmée. Nous proposons deux expériences principales pour atteindre cet objectif : 1-/ Analyser et comparer le profil du sécrétome deglycosylé avec le sécrétome normale et évaluer la réactivité des sérums testés sur ce sécrétome deglycosylé ; 2-/ Réaliser une chromatographie d'exclusion et récupérer les fractions à des tailles correspondantes aux protéines détectées en immunoblotting. Ces fractions pourraient ensuite être soumises de nouveau à l'immunoblotting et à une nouvelle analyse protéomique pour identification. Les protéines identifiées par cette analyse pourront être soumises à une analyse bio-informatique qui aura pour objectif d'identifier les protéines homologues ou orthologues chez les autres espèces de trypanosomes (*T. vivax* et *T.b brucei*).

Deuxièmement, le profil des réponses anticorps des races bovines pourrait être analysé davantage sur les immunoblots déjà réalisés et éventuellement sur les fractions de gel filtration. Car si les quatre bandes de protéines ont été retrouvées chez les différentes races, l'intensité de la réaction des sérums à ces protéines semble varier en fonction de la race. En plus, d'autres protéines notamment à 51 et à 35 kDa sont spécifiquement détectées chez les lagunaires et les n'dama respectivement. Une exploration de ces données pourrait contribuer à la compréhension du mécanisme mo-

léculaire de la trypanotolérance chez certaines races bovines et mieux, établir un lien entre les facteurs pathogéniques sécrétés par les trypanosomes et la tolérance des bovins.

Algorithme de dépistage de la trypanosomose animale africaine

Une fois les choix des candidats clairement définis après l'identification des protéines immunoréactives, des chimères issues du génie génétique et composées d'épitopes de plusieurs protéines pourront être synthétisées. Dans un souci de facilité et de coût de production, mais aussi de standardisation, ces chimères pourront être utilisées à la place des protéines recombinantes comme antigènes. Pour la détection spécifique d'une espèce donnée, la chimère sera constituée des peptides provenant uniquement de protéines de cette espèce. Et pour la détection pan-trypanosomes, la chimère sera synthétisée en combinant plusieurs peptides provenant des protéines des trois espèces impliquées dans la *nagana* (*T. congolense*, *T.b brucei* et *T. vivax*). Nous avons proposé en conclusion de la revue sur les méthodes de diagnostic (Tounkara et al., 2021), la nécessité d'un algorithme pour le diagnostic de la TAA en fonction du contexte épidémiologique. Les approches proposées ici, combinaison des protéines immuoréactives et chimères de protéines, permettront de répondre à la seconde recommandation formulée dans cet algorithme, à savoir l'amélioration et le développement de tests pour le terrain. Grâce aux tests d'immuno-chromatographie qui seront développés à partir de ces nouveaux types d'antigènes, la mise en oeuvre de cet algorithme de diagnostic devrait aider au contrôle, à la surveillance et surtout au choix d'une chimiothérapie adéquate de la trypanosomose animale africaine. Par analogie avec la THA, les programmes de contrôle progressif de la TAA pourront se concrétiser.

Bibliographie

- Adams, E. R., Hamilton, P. B. and Gibson, W. C. (2010), 'African trypanosomes : celebrating diversity', Trends in parasitology **26**(7), 324–328. [12](#)
- Akiyoshi, B. and Gull, K. (2013), 'Evolutionary cell biology of chromosome segregation : Insights from trypanosomes', Open biology **3**, 130023. [19](#)
- Akol, G. W. O. and Murray, M. (1986), 'Parasite kinetics and immune responses in efferent pre-femoral lymph draining skin reactions induced by tsetse-transmitted *Trypanosoma congolense*', Veterinary Parasitology **19**(3), 281–293.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304401786900750> [22](#)
- Ammar, Z. (2013), Caractérisation de l'interaction entre les trypanosomes africains et les cellules endothéliales : activation, inflammation et rôle des trans-sialidases, PhD thesis, Bordeaux 2. [7](#)
- Anene, B. M., Onah, D. N. and Nawa, Y. (2001), 'Drug resistance in pathogenic African trypanosomes : what hopes for the future ?', Veterinary Parasitology **96**(2), 83–100.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401700004271> [47](#)
- Antoine-Moussiaux, N., Büscher, P. and Desmecht, D. (2009), 'Host-parasite interactions in trypanosomiasis : on the way to an antidisease strategy', Infection and immunity **77**(4), 1276–1284. [35](#)
- Are, E. B. and Hargrove, J. W. (2020), 'Extinction probabilities as a function of temperature for populations of tsetse (*Glossina* spp.)', PLoS neglected tropical diseases **14**(5), e0007769. [28](#)
- Autheman, D., Crosnier, C., Clare, S., Goulding, D. A., Brandt, C., Harcourt, K., Tolley, C., Galaway, F., Khushu, M., Ong, H. et al. (2021), 'An invariant *Trypanosoma vivax* vaccine antigen induces protective immunity', Nature pp. 1–5. [3](#), [25](#), [45](#)
- Authié, E. (1994), 'Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle : A role for congopain?', Parasitology Today **10**(9), 360–364.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475894902526> [36](#), [37](#), [38](#), [39](#)
- Authié, E. (2003), 'Trypanosomoses : physiopathologie en immunologie'. ISBN : 9782743004958 Publisher : Lavoisier Tec et Doc.
URL: <https://agritrop.cirad.fr/515185/> [35](#)
- Authié, E., Boulangé, A., Muteti, D., Lalmanach, G., Gauthier, F. and Musoke, A. J. (2001), 'Immunisation of cattle with cysteine proteinases of *Trypanosoma congolense* : targeting the disease rather than the parasite', International Journal for Parasitology **31**(13), 1429–1433.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751901002661> [45](#), [78](#)
- Authié, E., Muteti, D. K. and Williams, D. J. L. (1993), 'Antibody responses to invariant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis', Parasite

- Immunology* **15**(2), 101–111. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00589.x>.
- URL:** <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3024.1993.tb00589.x> **23, 38, 45, 78, 169, 182**
- Balogun, E. O., Inaoka, D. K., Shiba, T., Kido, Y., Nara, T., Aoki, T., Honma, T., Tanaka, A., Inoue, M., Matsuoka, S., Michels, P. A., Harada, S. and Kita, K. (2013), 'Biochemical characterization of highly active *Trypanosoma brucei gambiense* glycerol kinase, a promising drug target', *The Journal of Biochemistry* **154**(1), 77–84.
- URL:** <https://doi.org/10.1093/jb/mvt037> **48**
- Bangs, J. D. (2018), 'Evolution of Antigenic Variation in African Trypanosomes : Variant Surface Glycoprotein Expression, Structure, and Function', *BioEssays* **40**(12), 1800181.
- URL:** <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/bies.201800181> **23, 24**
- Baral, T. N. (2010), 'Immunobiology of African Trypanosomes : Need of Alternative Interventions'. ISSN : 2314-6133 Pages : e389153 Publisher : Hindawi Volume : 2010.
- URL:** <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/389153/> **43**
- Barry, D., Carrington, M. et al. (2004), 'Antigenic variation', *The trypanosomiases*. CABI, Wallingford, UK and Cambridge, Massachusetts, USA pp. 25–37. **24**
- BEI-Resources (2021), 'BEI Reagent Search'.
- URL:** <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIParasiticProtozoa/NR-42009.aspx> **88**
- Bengaly, Z. (2003), Pathogénicité comparée de trois types phylogénétiques distincts de l'espèce de *Trypanosoma congolense*, PhD thesis, Thèse Doct 3 e cycle : Parasitologie : université de Ouagadougou. **12**
- Bengaly, Z., Kanwe, A. B. and Duvallet, G. (1995), 'Evaluation of an antigen detection-ELISA test for the diagnosis of trypanosomiasis in naturally infected cattle', *Trop. Med. Parasitol.* **46**(4), 284–286. **69**
- Bengaly, Z., Sidibe, I., Ganaba, R., Desquesnes, M., Boly, H. and Sawadogo, L. (2002), 'Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle : clinical observations and haematological changes', *Veterinary Parasitology* **108**(1), 1–19.
- URL:** <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702001644> **36, 39**
- Bengaly, Z., Vitouley, S. H., Somda, M. B., Zongo, A., Têko-Agbo, A., Cecchi, G., Adam, Y., Sidibé, I., Bayala, B., Belem, A. M. G., Van Den Abbeele, J. and Delespaux, V. (2018), 'Drug quality analysis of isometamidium chloride hydrochloride and diminazene diaceturate used for the treatment of African animal trypanosomosis in West Africa', *BMC Veterinary Research* **14**(1), 361.
- URL:** <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1633-7> **3, 47**
- Berthier, D., Peylhard, M., Dayo, G.-K., Flori, L., Sylla, S., Bolly, S., Sakande, H., Chantal, I. and Thevenon, S. (2015), 'A Comparison of Phenotypic Traits Related to Trypanotolerance in Five West African Cattle Breeds Highlights the Value of Shorthorn Taurine Breeds', *PLoS One* **10**(5).
- URL:** <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4425517/> **37, 38, 95, 164**
- Berthier, D., Quéré, R., Thevenon, S., Belemsaga, D., Piquemal, D., Marti, J. and Maillard, J.-C. (2003), 'Serial analysis of gene expression (SAGE) in bovine trypanotolerance : preliminary results', *Genet. Sel. Evol.* **35**(Suppl. 1), S35–S47. Publisher : EDP Sciences.
- URL:** <http://dx.doi.org/10.1051/gse:2003015> **38**

- Bilgraer, R. (2014), Déchiffrer le code histone : épigénétique et toxicologie placentaire, Theses, Université René Descartes - Paris V.
URL: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01195983> 82
- Black, S. J. and Mansfield, J. M. (2016), 'Prospects for vaccination against pathogenic African trypanosomes', *Parasite Immunology* **38**(12), 735–743. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/pim.12387>.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pim.12387> 24
- Boonjakuakul, J. K., Gerns, H. L., Chen, Y.-T., Hicks, L. D., Minnick, M. F., Dixon, S. E., Hall, S. C. and Koehler, J. E. (2007), 'Proteomic and Immunoblot Analyses of Bartonella quintana Total Membrane Proteins Identify Antigens Recognized by Sera from Infected Patients', *Infection and Immunity* **75**(5), 2548–2561. Publisher : American Society for Microbiology Journals Section : BACTERIAL INFECTIONS.
URL: <https://iai.asm.org/content/75/5/2548> 80
- Borst, P., Fase-Fowler, F. and Gibson, W. C. (1987), 'Kinetoplast DNA of Trypanosoma evansi', *Molecular and Biochemical Parasitology* **23**(1), 31–38.
URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0166685187901848> 57, 75
- Bossard, G., Boulange, A., Holzmuller, P., Thevenon, S., Patrel, D. and Authie, E. (2010), 'Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA', *Vet Parasitol* **173**(1-2), 39–47. 4, 151, 157
- Boulangé, A., Serveau, C., Brillard, M., Minet, C., Gauthier, F., Diallo, A., Lalmanach, G. and Authié, E. (2001), 'Functional expression of the catalytic domains of two cysteine proteinases from trypanosoma congolense', *International journal for parasitology* **31**(13), 1435–1440. 159, 160
- Boulangé, A.-F. (1995), Clonage et expression des gènes codant pour une HSP70/BIP et une cystéineprotéase de trypanosoma congolense : utilisation de ces antigènes dans l'étude de la trypanotolérance bovine, These de doctorat, Bordeaux 2.
URL: <http://www.theses.fr/1995BOR28361> 103
- Boulangé, A., Katende, J. and Authié, E. (2002), 'Trypanosoma congolense : Expression of a Heat Shock Protein 70 and Initial Evaluation as a Diagnostic Antigen for Bovine Trypanosomosis', *Experimental Parasitology* **100**(1), 6–11.
URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489401946673> 4, 67, 103, 151, 159
- Boulangé, A., Pillay, D., Chevzoff, C., Biteau, N., Comé de Graça, V., Rempeters, L., Theodoridis, D. and Baltz, T. (2017), 'Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis', *Veterinary Parasitology* **233**, 32–38.
URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401716304964> 4, 5, 69, 71, 77, 96, 147, 186
- Bouyer, F., Bouyer, J., Seck, M., Sall, B., Dicko, A., Lancelot, R., Chia, E. et al. (2015), 'Importance of vector-borne infections in different production systems : bovine trypanosomosis and the innovation dynamics of livestock producers in senegal', *Rev Sci Tech Off Int Epiz* **34**, 213–225. 48
- Bouyer, J., Balenghien, T., Ravel, S., Vial, L., Sidibé, I., Thévenon, S., Solano, P. and Meeûs, T. D. (2009), 'Population sizes and dispersal pattern of tsetse flies : rolling on the river?', *Molecular Ecology* **18**(13), 2787–2797. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-294X.2009.04233.x>.

URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-294X.2009.04233.x> 49, 50

Bouyer, J., Ravel, S., Guerrini, L., Dujardin, J.-P., Sidibé, I., Vreysen, M. J. B., Solano, P. and De Meeûs, T. (2010), 'Population structure of *Glossina palpalis gambiensis* (Diptera : Glossinidae) between river basins in Burkina Faso : Consequences for area-wide integrated pest management', *Infection, Genetics and Evolution* **10**(2), 321–328.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134810000043> 30, 49

Bradley, D. G., MacHugh, D. E., Cunningham, P. and Loftus, R. T. (1996), 'Mitochondrial diversity and the origins of african and european cattle', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(10), 5131–5135. 37

Bringaud, F. and Baltz, T. (1992), 'A potential hexose transporter gene expressed predominantly in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*', *Molecular and Biochemical Parasitology* **52**(1), 111–121.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016668519290040Q> 75

Brown, K. (2008), 'From ubombo to mkhuzi : disease, colonial science, and the control of nagana (livestock trypanosomosis) in zululand, south africa, c. 1894–1953', *Journal of the history of medicine and allied sciences* **63**(3), 285–322. 8

Büscher, P., Shamamba, S. K. B., Ngoyi, D. M., Pyana, P., Baelmans, R., Magnus, E. and Overmeir, C. V. (2005), 'Susceptibility of *grammomys surdaster* thicket rats to *trypanosoma brucei gambiense* infection', *Tropical Medicine & International Health* **10**(9), 850–855. 54

Buxton, P. A. et al. (1955), 'The natural history of tsetse flies. an account of the biology of the genus *Glossina* (diptera).', *The Natural History of Tsetse Flies. An Account of the Biology of the Genus Glossina (Diptera)*. (10). 27

Büscher, P., Bart, J.-M., Boelaert, M., Bucheton, B., Cecchi, G., Chitnis, N., Courtin, D., Figueiredo, L. M., Franco, J.-R., Grébaut, P., Hasker, E., Ilboudo, H., Jamonneau, V., Koffi, M., Lejon, V., MacLeod, A., Masumu, J., Matovu, E., Mattioli, R., Noyes, H., Picado, A., Rock, K. S., Rotureau, B., Simo, G., Thévenon, S., Trindade, S., Truc, P. and Van Reet, N. (2018), 'Do Cryptic Reservoirs Threaten Gambiense-Sleeping Sickness Elimination?', *Trends in Parasitology* **34**(3), 197–207.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492217302829> 11

Büscher, P., Gonzatti, M. I., Hébert, L., Inoue, N., Pascucci, I., Schnauffer, A., Suganuma, K., Touratier, L. and Van Reet, N. (2019), 'Equine trypanosomosis : enigmas and diagnostic challenges', *Parasites & Vectors* **12**(1).

URL: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-019-3484-x> 3, 4, 52, 61, 66, 184

Calomeno, N. A., Moreira, R. S., Fernandes, L. A., Batista, F., Marques, J., Wagner, G. and Miletti, L. C. (2021), 'Serum proteomic signature of *Trypanosoma evansi* –infected mice for identification of potential biomarkers', *Veterinary Parasitology* **290**, 109342.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401721000029> 82, 84

Camara, M., Camara, O., Ilboudo, H., Sakande, H., Kaboré, J., N'Dri, L., Jamonneau, V. and Bucheton, B. (2010), 'Sleeping sickness diagnosis : use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test', *Tropical Medicine & International Health* **15**(7), 796–799. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x>.

URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3156.2010.02546.x> 54, 64

- Capewell, P., Cren-Travaillé, C., Marchesi, F., Johnston, P., Clucas, C., Benson, R. A., Gorman, T.-A., Calvo-Alvarez, E., Crouzols, A., Jouvion, G. et al. (2016), 'The skin is a significant but overlooked anatomical reservoir for vector-borne african trypanosomes', Elife **5**, e17716. **13**
- Caraballo-Guzmán, A. J., Ospina-Villa, J. D., Cuesta-Caicedo, A. P. and Sánchez-Jiménez, M. M. (n.d.), 'Immunoproteomics characterization of Leishmania panamensis proteins for potential clinical diagnosis of mucosal Leishmaniasis', Parasite Immunology **n/a**(n/a), e12824. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/pim.12824>.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pim.12824> **80**
- Cauchard, J., Soldan, A., Madeline, A., Johnson, P., Büscher, P. and Petry, S. (2014), 'Inter-laboratory ring trials to evaluate serological methods for dourine diagnosis', Vet. Parasitol. **205**(1-2), 70–76. **65**
- Cazorla, S. I., Frank, F. M. and Malchiodi, E. L. (2009), 'Vaccination approaches against Trypanosoma cruzi infection', Expert Review of Vaccines **8**(7), 921–935. Publisher : Taylor & Francis eprint : <https://doi.org/10.1586/erv.09.45>.
URL: <https://doi.org/10.1586/erv.09.45> **45**
- Chalmin, P., Jégourel, Y. et al. (2019), 'Arcadia 2019 : l'Afrique et les marchés mondiaux de matières premières', Books & Reports . **40**
- Champagne, D. E. (2004), 'Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods', Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders **4**(4), 375–396. **31**
- Chartier, C., Itard, J. and Morel, P.-C. (2000), Précis de parasitologie vétérinaire tropicale, Éditions Tec & Doc. **35**
- Chen, K. K. and Donelson, J. E. (1980), 'Sequences of two kinetoplast dna minicircles of trypanosoma brucei', Proceedings of the National Academy of Sciences **77**(5), 2445–2449. **27**
- Chitanga, S., Marcotty, T., Namangala, B., Bossche, P. V. d., Abbeele, J. V. D. and Delespaux, V. (2011), 'High Prevalence of Drug Resistance in Animal Trypanosomes without a History of Drug Exposure', PLOS Neglected Tropical Diseases **5**(12), e1454. Publisher : Public Library of Science.
URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001454> **3**
- Clausen, P. H., Sidibé, I., Bassinga, A., Richard, X., Bauer, B. and Pohlitz, H. (1993), 'Pathogenesis and pathology of African trypanosomiasis in Baoulé, N'Dama/Baoulé cross bred and Zebu cattle in Burkina Faso. 1. Clinical performance under high natural tsetse challenge', Trop Med Parasitol **44**(2), 99–107. **22**
- Cooper, S., Wadsworth, E. S., Ochsenreiter, T., Ivens, A., Savill, N. J. and Schnauffer, A. (2019), 'Assembly and annotation of the mitochondrial minicircle genome of a differentiation-competent strain of Trypanosoma brucei', Nucleic Acids Res **47**(21), 11304–11325. Publisher : Oxford Academic.
URL: <https://academic.oup.com/nar/article/47/21/11304/5609525> **27**
- Cortez, A. P., Rodrigues, A. C., Garcia, H. A., Neves, L., Batista, J. S., Bengaly, Z., Paiva, F. and Teixeira, M. M. (2009), 'Cathepsin L-like genes of Trypanosoma vivax from Africa and South America—characterization, relationships and diagnostic implications', Mol Cell Probes **23**(1), 44–51. **181**
- Cross, G. A. M., Kim, H.-S. and Wickstead, B. (2014), 'Capturing the variant surface glycoprotein repertoire (the VSGnome) of Trypanosoma brucei Lister 427', Molecular and

- Biochemical Parasitology **195**(1), 59–73.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685114000772> **24**
- Cuisance, D. (1995), 'Les grandes endémies parasitaires à transmission vectorielle. Glossines et trypanosomes'. Publisher : CIRAD-EMVT.
URL: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=FR2019132684> **18, 31**
- Dalton, J. P. and Mulcahy, G. (2001), 'Parasite vaccines — a reality?', Veterinary Parasitology **98**(1), 149–167.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401701004307> **43**
- Delespaux, V., Geysen, D., Van den Bossche, P. and Geerts, S. (2008), 'Molecular tools for the rapid detection of drug resistance in animal trypanosomes', Trends in Parasitology **24**(5), 236–242.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492208000871> **48**
- Deschamps, J.-Y., Desquesnes, M., Dorso, L., Ravel, S., Bossard, G., Charbonneau, M., Garand, A. and Roux, F. A. (2016), 'Refractory hypoglycaemia in a dog infected with trypanosoma congolense', Parasite **23**. **36**
- Desquesnes, M. (1997), 'Standardisations internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthodes, intérêts et limites : -EN- -FR- -ES-', Revue Scientifique et Technique de l'OIE **16**(3), 809–823.
URL: <https://doc.oie.int/dyn/portal/index.seam?page=aloalold=30114> **66**
- Desquesnes, M., Bossard, G., Patrel, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Thevenon, S., Berthier, D., Pavlovic, D., Brugidou, R. et al. (2008), 'First outbreak of trypanosoma evansi in camels in metropolitan france', Veterinary Record **162**(23), 750–752. **13, 32, 33**
- Desquesnes, M., Bossard, G., Thévenon, S., Patrel, D., Ravel, S., Pavlovic, D., Herder, S., Patout, O., Lepetitcolin, E., Holzmuller, P. et al. (2009), 'Development and application of an antibody-elisa to follow up a trypanosoma evansi outbreak in a dromedary camel herd in france', Veterinary Parasitology **162**(3-4), 214–220. **4**
- Desquesnes, M. and de La Rocque, S. (1995), 'Comparison of the sensitivity of the Woo test and a test for detecting antigens to Trypanosoma vivax in 2 sheep experimentally infected with a Guyanese strain of the parasite', Rev Elev Med Vet Pays Trop **48**(3), 247–253. **55, 69**
- Desquesnes, M. and Dia, M. L. (2003), 'Trypanosoma vivax : mechanical transmission in cattle by one of the most common african tabanids, atylotus agrestis', Experimental parasitology **103**(1-2), 35–43. **32, 53**
- Desquesnes, M. and Dia, M. L. (2004), 'Mechanical transmission of trypanosoma vivax in cattle by the african tabanid atylotus fuscipes', Veterinary parasitology **119**(1), 9–19. **32**
- Desquesnes, M., Dia, M. L., Acapovi, G. and Yoni, W. (2005), 'Les vecteurs mécaniques des trypanosomoses animales : généralité, morphologie, biologie, impacts et contrôle. identification des espèces les plus abondantes en afrique de l'ouest'. **12, 32**
- Desquesnes, M. and Dávila, A. M. R. (2002), 'Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes : a review and perspectives', Veterinary Parasitology **109**(3), 213–231.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702002704> **56, 184**
- Desquesnes, M., Holzmuller, P., Lai, D.-H., Dargantes, A., Lun, Z.-R. and Jittaplapong, S.

- (2013), 'Trypanosoma evansi and Surra : A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects', BioMed Research International **2013**, 1–22.
URL: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/194176/> **2, 13, 34**
- D'leteren, G., Authié, E., Wissocq, N. and Murray, M. (1998), 'Trypanotolerance, an option for sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomiasis', Revue Scientifique et Technique d l'OIE . **48**
- Duncan, L. R., Gay, L. S. and Donelson, J. E. (1991), 'African trypanosomes express an immunogenic protein with a repeating epitope of 24 amino acids', Molecular and Biochemical Parasitology **48**(1), 11–16.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0166685191901594> **77**
- Duschak, V. G. and Couto, A. S. (2009), 'Cruzipain, the Major Cysteine Protease of Trypanosoma cruzi : A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine Development and Drug Target. A Review', Current Medicinal Chemistry **16**(24), 3174–3202. **45**
- Dutton, J. (1902), Preliminary note upon a trypanosome occurring in the blood of man, Technical Report IV, Thompson Yates and Johnston Laboratories.
URL: <http://wellcomelibrary.org/item/b2241356x> **10**
- Eiken (n.d.), '[Eiken GENOME SITE] - The principle of LAMP method'.
URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/> **58, 59**
- Eisler, M. C., Dwinger, R. H., Majiwa, P. a. O. and Picozzi, K. (2004), 'Diagnosis and epidemiology of African animal trypanosomiasis.', The trypanosomiasis pp. 253–267. Publisher : CABI Publishing.
URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043124843> **51**
- El-Sayed, N. M., Hegde, P., Quackenbush, J., Melville, S. E. and Donelson, J. E. (2000), 'The African trypanosome genome', International Journal for Parasitology **30**(4), 329–345.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751900000151> **17, 25, 26**
- Elsen, P., Amoudi, M., Leclercq, M. et al. (1990), 'First record of glossina fuscipes fuscipes newstead, 1910 and glossina morsitans submorsitans newstead, 1910 in southwestern saudi arabia', Ann. Soc. Bel. Med. Trop **70**(4), 281–287. **28**
- Engvall, E. and Perlmann, P. (1971), 'Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G', Immunochemistry **8**(9), 871–874.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001927917190454X> **67**
- Enyaru, J. C., Ouma, J. O., Malele, I. I., Matovu, E. and Masiga, D. K. (2010), 'Landmarks in the evolution of technologies for identifying trypanosomes in tsetse flies', Trends in Parasitology **26**(8), 388–394.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471492210000875> **8**
- Eyssen, L. E. A., Vather, P., Jackson, L., Ximba, P., Biteau, N., Baltz, T., Boulangé, A., Büscher, P. and Coetzer, T. H. T. (2018), 'Recombinant and native TviCATL from Trypanosoma vivax : Enzymatic characterisation and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomiasis', Molecular and Biochemical Parasitology **223**, 50–54.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685118300823> **4, 151, 157, 160, 181, 186**
- FAO (2020), 'The disease | Programme Against African Trypanosomiasis (PAAT) | Food and

Agriculture Organization of the United Nations’.

URL: <http://www.fao.org/paat/the-programme/the-disease/en/> 3, 40, 41, 47

Farikou, O., Njiokou, F., Mbida, J. A. M., Njitchouang, G. R., Djeunga, H. N., Asonganyi, T., Simarro, P. P., Cuny, G. and Geiger, A. (2010), ‘Tripartite interactions between tsetse flies, *Sodalis glossinidius* and trypanosomes—an epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon’, *Infection, Genetics and Evolution* **10**(1), 115–121. 31

Fischbach, J., Xander, N. C., Frohme, M. and Glökler, J. F. (2015), ‘Shining a light on LAMP assays’ A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine’, *BioTechniques* **58**(4), 189–194. Publisher : Future Science.

URL: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/000114275> 58

Fleming, J. R., Sastry, L., Crozier, T. W. M., Napier, G. B., Sullivan, L. and Ferguson, M. A. J. (2014), ‘Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for *Trypanosoma congolense*’, *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**(6), e2936.

URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002936> 4, 67, 69, 74, 82, 159, 181

Fleming, J. R., Sastry, L., Wall, S. J., Sullivan, L. and Ferguson, M. A. J. (2016), ‘Proteomic Identification of Immunodiagnostic Antigens for *Trypanosoma vivax* Infections in Cattle and Generation of a Proof-of-Concept Lateral Flow Test Diagnostic Device’, *PLOS Neglected Tropical Diseases* **10**(9), e0004977.

URL: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004977> 4, 67, 69, 71, 74

Franco, J. R., Simarro, P. P., Diarra, A. and Jannin, J. G. (2014), ‘Epidemiology of human African trypanosomiasis’, *Clin Epidemiol* **6**, 257–275.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4130665/> 10, 11

Garcia, A., Jamonneau, V., Magnus, E., Laveissière, C., Lejon, V., N’guessan, P., N’dri, L., Meirvenne, N. V. and Büscher, P. (2000), ‘Follow-up of Card Agglutination Trypanosomiasis Test (CATT) positive but apparently aparasitaemic individuals in Côte d’Ivoire : evidence for a complex and heterogeneous population’, *Tropical Medicine & International Health* **5**(11), 786–793.
_eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.1365-3156.2000.00623.x>.

URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-3156.2000.00623.x> 43

Geiger, A., Hirtz, C., Bécue, T., Bellard, E., Centeno, D., Gargani, D., Rossignol, M., Cuny, G. and Peltier, J.-B. (2010), ‘Exocytosis and protein secretion in *Trypanosoma*’, *BMC Microbiol* **10**, 20.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224696/> 163, 180

Geiger, A., Ravel, S., Mateille, T., Janelle, J., Patrel, D., Cuny, G. and Frutos, R. (2007), ‘Vector competence of *Glossina palpalis gambiensis* for *Trypanosoma brucei* s.l. and genetic diversity of the symbiont *Sodalis glossinidius*’, *Molecular biology and evolution* **24**(1), 102–109. 31

Geysen, D., Delespaux, V. and Geerts, S. (2003), ‘PCR–RFLP using *Ssu*-rDNA amplification as an easy method for species-specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle’, *Veterinary Parasitology* **110**(3), 171–180.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304401702003138> 57

Gibson, W. (2015), ‘Liaisons dangereuses : sexual recombination among pathogenic trypanosomes’, *Research in microbiology* **166**(6), 459–466. 18

Gibson, W. and Peacock, L. (2019), ‘Fluorescent proteins reveal what trypanosomes get up to

- inside the tsetse fly', *Parasites & vectors* **12**(1), 1–8. [18](#)
- Giordani, F., Morrison, L. J., Rowan, T. G., De Koning, H. P. and Barrett, M. P. (2016), 'The animal trypanosomiasis and their chemotherapy : a review', *Parasitology* **143**(14), 1862–1889.
URL: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182016001268/type/journal_article [2](#), [13](#), [14](#), [15](#), [40](#), [46](#), [47](#), [52](#)
- Grab, D. J., Webster, P., Ito, S., Fish, W. R., Verjee, Y. and Lonsdale-Eccles, J. D. (1987), 'Subcellular localization of a variable surface glycoprotein phosphatidylinositol-specific phospholipase-C in African trypanosomes.', *Journal of Cell Biology* **105**(2), 737–746.
URL: <https://doi.org/10.1083/jcb.105.2.737> [75](#)
- Grebaut, P., Chuchana, P., Brizard, J. P., Demettre, E., Seveno, M., Bossard, G., Jouin, P., Vincendeau, P., Bengaly, Z., Boulange, A., Cuny, G. and Holzmuller, P. (2009), 'Identification of total and differentially expressed excreted-secreted proteins from *Trypanosoma congolense* strains exhibiting different virulence and pathogenicity', *Int J Parasitol* **39**(10), 1137–50. [163](#), [180](#), [181](#), [182](#)
- Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A. J., Bringaud, F., Concepción, J. L. and Michels, P. A. (2012), 'When, how and why glycolysis became compartmentalised in the kinetoplast. a new look at an ancient organelle', *International journal for parasitology* **42**(1), 1–20. [17](#)
- Gull, K. (2003), 'Host–parasite interactions and trypanosome morphogenesis : a flagellar pocketful of goodies', *Current Opinion in Microbiology* **6**(4), 365–370.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403000924> [16](#)
- Habibzadeh, F., Habibzadeh, P. and Yadollahie, M. (2016), 'On determining the most appropriate test cut-off value : the case of tests with continuous results', *Biochem Med (Zagreb)* **26**(3), 297–307.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5082211/> [110](#)
- Hailu, M. (2019), 'Review on Diagnostic Methods of Trypanosomiasis', *Journal of Dairy & Veterinary Sciences* **11**(3).
URL: <https://juniperpublishers.com/jdvs/JDVS.MS.ID.555812.php> [3](#), [4](#), [54](#)
- Hanotte, O., Bradley, D. G., Ochieng, J. W., Verjee, Y., Hill, E. W. and Rege, J. E. O. (2002), 'African pastoralism : genetic imprints of origins and migrations', *Science* **296**(5566), 336–339. [36](#), [37](#)
- Hanotte, O., Ronin, Y., Agaba, M., Nilsson, P., Gelhaus, A., Horstmann, R., Sugimoto, Y., Kemp, S., Gibson, J., Korol, A. et al. (2003), 'Mapping of quantitative trait loci controlling trypanotolerance in a cross of tolerant west african n'dama and susceptible east african boran cattle', *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(13), 7443–7448. [37](#)
- Hoare, C. A. et al. (1972), 'The trypanosomes of mammals. a zoological monograph.', *The trypanosomes of mammals. A zoological monograph.* . [8](#)
- Holmes, P. H., Eisler, M. C. and Geerts, S. (2004), *Current chemotherapy of animal trypanosomiasis*, CABI Publishing. Accepted : 2007-12-06T14 :37 :37Z.
URL: <http://dspace.itg.be/handle/10390/723> [2](#), [47](#)
- Holzmuller, P., Grebaut, P., Peltier, J. B., Brizard, J. P., Perrone, T., Gonzatti, M., Bengaly, Z., Rossignol, M., Aso, P. M., Vincendeau, P., Cuny, G., Boulange, A. and Frutos, R. (2008),

- 'Secretome of animal trypanosomes', *Ann N Y Acad Sci* **1149**, 337–42. [82](#), [163](#), [180](#)
- Hope, M., MacLeod, A., Leech, V., Melville, S., Sasse, J., Tait, A. and Turner, C. M. R. (1999), 'Analysis of ploidy (in megabase chromosomes) in *Trypanosoma brucei* after genetic exchange', *Molecular and Biochemical Parasitology* **104**(1), 1–9.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685199001036> [18](#)
- Horn, D. (2014), 'Antigenic variation in African trypanosomes', *Molecular and Biochemical Parasitology* **195**(2), 123–129.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685114000590> [3](#), [14](#), [23](#)
- Ijagbone, I. F., Staak, C. and Reinhard, R. (1989), 'Fractionation of trypanosome antigens for species-specific sero-diagnosis', *Vet. Parasitol.* **32**(4), 293–299. [67](#), [184](#)
- Ilboudo, H., Bras-Gonçalves, R., Camara, M., Flori, L., Camara, O., Sakande, H., Leno, M., Petitdidier, E., Jamonneau, V. and Bucheton, B. (2014), 'Unravelling human trypanotolerance : Il8 is associated with infection control whereas il10 and tnfa are associated with subsequent disease development', *PLoS Pathog* **10**(11), e1004469. [43](#)
- Itard, J. (1986), 'Les glossines ou mouches tsé-tsé'. [28](#)
- Itard, J. (2000), 'Les trypanosomoses animales africaines', *Précis de parasitologie vétérinaire tropicale*. Editions médicales internationales. Paris, France : Lavoisier Tec et Doc pp. 206–450. [12](#), [13](#), [32](#)
- Itard, J., Cuisance, D. and Tacher, G. (2003), 'Trypanosomoses : historique-répartition géographique'. [2](#)
- Itard, J., Troncy, P. and Morel, P. (1981), 'Précis de parasitologie vétérinaire tropicale', Paris, France, Ministère de la coopération et du développement . [31](#)
- Jackson, A. P., Goyard, S., Xia, D., Foth, B. J., Sanders, M., Wastling, J. M., Minoprio, P. and Berriman, M. (2015), 'Global Gene Expression Profiling through the Complete Life Cycle of *Trypanosoma vivax*', *PLOS Neglected Tropical Diseases* **9**(8), e0003975.
URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003975> [20](#), [21](#), [22](#)
- Jackson, D. G., Windle, H. J. and Voorheis, H. P. (1993), 'The identification, purification, and characterization of two invariant surface glycoproteins located beneath the surface coat barrier of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*.' , *Journal of Biological Chemistry* **268**(11), 8085–8095.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818530660> [74](#)
- Jamonneau, V., Bucheton, B., Kaboré, J., Ilboudo, H., Camara, O., Courtin, F., Solano, P., Kaba, D., Kambire, R., Lingue, K., Camara, M., Baelmans, R., Lejon, V. and Büscher, P. (2010), 'Revisiting the Immune Trypanolysis Test to Optimise Epidemiological Surveillance and Control of Sleeping Sickness in West Africa', *PLOS Neglected Tropical Diseases* **4**(12), e917. Publisher : Public Library of Science.
URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000917> [64](#)
- Jamonneau, V., Ilboudo, H., Kaboré, J., Kaba, D., Koffi, M., Solano, P., Garcia, A., Courtin, D., Laveissière, C., Lingue, K., Büscher, P. and Bucheton, B. (2012), 'Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei gambiense* Are Not 100% Fatal', *PLOS Neglected Tropical Diseases* **6**(6), e1691. Publisher : Public Library of Science.
URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001691> [43](#)

- Jarra, W. and Snounou, G. (1998), 'Only Viable Parasites Are Detected by PCR following Clearance of Rodent Malarial Infections by Drug Treatment or Immune Responses', *Infect Immun* **66**(8), 3783–3787.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC108417/> 61
- Johnson, N. P. (2004), 'Advantages to transforming the receiver operating characteristic (ROC) curve into likelihood ratio co-ordinates', *Statistics in Medicine* **23**(14), 2257–2266. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/sim.1835>.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/sim.1835> 110, 151
- Jordan, A. M. et al. (1986), *Trypanosomiasis control and African rural development*, Vol. 357, Longman London. 30
- Kalu, A. U., Edeghere, H. U. and Lawani, F. A. (1986), 'Comparison of diagnostic techniques during subclinical single infections of trypanosomiasis in goats', *Veterinary Parasitology* **22**(1), 37–47.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304401786900051> 52
- Karl, J., Wild, N., Tacke, M., Andres, H., Garczarek, U., Rollinger, W. and Zolg, W. (2008), 'Improved diagnosis of colorectal cancer using a combination of fecal occult blood and novel fecal protein markers', *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **6**(10), 1122–1128. 157
- Kashiwazaki, Y., Snowden, K., Smith, D. H. and Hommel, M. (1994), 'A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle', *Vet. Parasitol.* **55**(1-2), 57–69. 69
- Katende, J. M., Nantulya, V. M. and Musoke, A. J. (1987), 'Comparison between bloodstream and procyclic form trypanosomes for serological diagnosis of African human trypanosomiasis', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**(4), 607–608.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920387904251> 66
- Kennedy, P. G. E. (2013), 'Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness)', *The Lancet Neurology* **12**(2), 186–194. 14
- Kimple, M. E., Brill, A. L. and Pasker, R. L. (2013), 'Overview of Affinity Tags for Protein Purification', *Curr Protoc Protein Sci* **73**, Unit–9.9.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4527311/> 159
- Krinsky, W. L. (2019), Chapter 18 - Tsetse Flies (Glossinidae), in G. R. Mullen and L. A. Durden, eds, 'Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)', Academic Press, pp. 369–382.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128140437000182> 28, 29
- Kristjanson, P. M., Swallow, B. M., Rowlands, G. J., Kruska, R. L. and de Leeuw, P. N. (1999), 'Measuring the costs of African animal trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research', *Agricultural Systems* **59**(1), 79–98.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308521X98000869> 3, 41, 42
- Kuboki, N., Inoue, N., Sakurai, T., Di Cello, F., Grab, D. J., Suzuki, H., Sugimoto, C. and Igarashi, I. (2003), 'Loop-Mediated Isothermal Amplification for Detection of African Trypanosomes', *Journal of Clinical Microbiology* **41**(12), 5517–5524.
URL: <http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.41.12.5517-5524.2003> 60
- Kumar, J., Chaudhury, A., Bera, B. C., Kumar, R., Kumar, R., Tatu, U. and Yadav, S. C. (2015), 'Production and preliminary evaluation of Trypanosoma evansi HSP70 for antibody detection in Equids', *Acta Parasit.* **60**(4), 727–734.

URL: <https://doi.org/10.1515/ap-2015-0104> 4, 147

La Greca, F. and Magez, S. (2011), 'Vaccination against trypanosomiasis', Hum Vaccin **7**(11), 1225–1233.

URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3323498/> 43, 44, 78

Laderach, D., Cerban, F., Motran, C., Vottero De Cima, E. and Gea, S. (1996), 'Trypanosoma cruzi : The major cysteinyl proteinase (cruzipain) is a relevant immunogen of parasite acidic antigens (FIII)', International Journal for Parasitology **26**(11), 1249–1254.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751996000999> 45

Lai, D.-H., Hashimi, H., Lun, Z.-R., Ayala, F. J. and Lukeš, J. (2008), 'Adaptations of trypanosoma brucei to gradual loss of kinetoplast dna : Trypanosoma equiperdum and trypanosoma evansi are petite mutants of t. brucei', Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(6), 1999–2004.

URL: <https://www.pnas.org/content/105/6/1999> 27

Land, K. J., Boeras, D. I., Chen, X.-S., Ramsay, A. R. and Peeling, R. W. (2019), 'Reassured diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes', Nature microbiology **4**(1), 46–54. 51

Lanham, S. M. and Godfrey, D. G. (1970), 'Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose', Experimental Parasitology **28**(3), 521–534.

URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014489470901207> 54, 67

Leak, S. G. (2009), Tsetse fly, in 'Encyclopedia of Insects', Elsevier, pp. 1020–1024. 31

Leak, S. G. A. (1999), Tsetse Biology and Ecology : Their Role in the Epidemiology and Control of Trypanosomosis, ILRI (aka ILCA and ILRAD). Google-Books-ID : J1latecW1BQC. 31

Leak, S. G. A., Kemp, S. J. and Teale, A. J. (1993), 'Responses of N'Dama X Boran crossbred cattle to experimental infection with Trypanosoma congolense'. Publisher : OAU/STRC.

URL: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=QT2016102053> 37

Lee, M. G., Russell, D. G., D'Alesandro, P. A. and Van der Ploeg, L. H. (1994), 'Identification of membrane-associated proteins in Trypanosoma brucei encoding an internal, EARLRAEE amino acid repeat.', Journal of Biological Chemistry **269**(11), 8408–8415.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925817372095> 77

Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., LOM, I. J. and Lynn, D. (1980), 'A Newly Revised Classification of the Protozoa* THE COMMITTEE ON SYSTEMATICS EVOLUTION OF THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGISTS', The Journal of protozoology **27**(1), 37–58. Publisher : Wiley Online Library. 9

Li, S.-Q., Yang, W.-B., Lun, Z.-R., Ma, L.-J., Xi, S.-M., Chen, Q.-L., Song, X.-W., Kang, J. and Yang, L.-Z. (2009), 'Immunization with recombinant actin from Trypanosoma evansi induces protective immunity against T. evansi, T. equiperdum and T. b. brucei infection', Parasitol Res **104**(2), 429–435.

URL: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1216-9> 43

Ligi, M., Sengupta, P. P., Rudramurthy, G. R. and Rahman, H. (2016), 'Flagellar antigen based CI-ELISA for sero-surveillance of surra', Veterinary Parasitology **219**, 17–23.

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030440171630019X> 75

Lubega, G. W., Byarugaba, D. K. and Prichard, R. K. (2002), 'Immunization with a tubulin-rich

- preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis', Experimental Parasitology **102**(1), 9–22.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014489402001406> 43, 181
- Luckins, A. G. (1977), 'Detection of antibodies in Trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay', Tropical Animal Health and Production **9**(1), 53–62.
URL: <http://link.springer.com/10.1007/BF02297393> 67
- Mabey, D., Peeling, R. W., Ustianowski, A. and Perkins, M. D. (2004), 'Diagnostics for the developing world', Nature Reviews Microbiology **2**(3), 231–240.
URL: <http://www.nature.com/articles/nrmicro841> 51
- MacHugh, D. E., Shriver, M. D., Loftus, R. T., Cunningham, P. and Bradley, D. G. (1997), 'Microsatellite dna variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*bos taurus* and *bos indicus*)', Genetics **146**(3), 1071–1086. 37
- Magalhães, F. B., Castro Neto, A. L., Nascimento, M. B., Santos, W. J. T., Medeiros, Z. M., Lima Neto, A. S., Costa, D. L., Costa, C. H. N., dos Santos, W. L. C., Pontes de Carvalho, L. C., Oliveira, G. G. S. and de Melo Neto, O. P. (2017), 'Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis', PLOS ONE **12**(9), e0184867.
URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0184867> 157
- Magez, S., Pinto, J., Obishakin, E. and Radwanska, M. (2020), 'Infections with extracellular trypanosomes require control by efficient innate immune mechanisms and can result in the destruction of the mammalian humoral immune system.', Frontiers in Immunology **11**, 382. 44
- Magyezi, B. G., Uthman, O., Kenneth, M., Mwijjwiga, W. E. and George, L. W. (2019), 'Anticytoskeleton Immunoscreening of *Trypanosoma brucei* Expression Library Reveals Novel Immunogenic Conserved Putative Proteins', Journal of Advances in Biology & Biotechnology pp. 1–11.
URL: <https://www.journaljabb.com/index.php/JABB/article/view/30104> 80
- Majiwa, P., Masake, R., Nantulya, V., Hamers, R. and Matthyssens, G. (1985), '*Trypanosoma* (*nannomonas*) *congolense* : identification of two karyotypic groups.', The EMBO journal **4**(12), 3307–3313. 12
- Mansfield, J. M. (1994), 'T-cell responses to the trypanosome variant surface glycoprotein : A new paradigm?', Parasitology Today **10**(7), 267–270.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475894901430> 38
- Matthews, K. R. and Gull, K. (1994), 'Cycles within cycles : The interplay between differentiation and cell division in *Trypanosoma brucei*', Parasitology Today **10**(12), 473–476.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475894901597> 23
- Maudlin, I., Holmes, P. H. and Miles, M. A., eds (2004), The trypanosomiasis, CABI, Wallingford.
URL: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20043124833> 8, 11
- McKean, P. G. (2003), 'Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*', Current Opinion in Microbiology **6**(6), 600–607.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527403001462> 18

- Melville, S. E., Leech, V., Gerrard, C. S., Tait, A. and Blackwell, J. M. (1998), 'The molecular karyotype of the megabase chromosomes of trypanosoma brucei and the assignment of chromosome markers', Molecular and biochemical parasitology **94**(2), 155–173. [25](#)
- Melville, S. E., Leech, V., Navarro, M. and Cross, G. A. (2000), 'The molecular karyotype of the megabase chromosomes of trypanosoma brucei stock 427', Molecular and biochemical parasitology **111**(2), 261–273. [25](#)
- Mendoza-Palomares, C., Biteau, N., Giroud, C., Coustou, V., Coetzer, T., Authié, E., Boulangé, A. and Baltz, T. (2008), 'Molecular and Biochemical Characterization of a Cathepsin B-Like Protease Family Unique to Trypanosoma congolense', Eukaryotic Cell **7**(4), 684–697.
URL: <https://ec.asm.org/content/7/4/684> [96](#), [186](#)
- Menet, M.-C. (2011), 'Principes de la spectrométrie de masse', Revue Francophone des Laboratoires **2011**(437), 41–53.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1773035X11712114> [81](#), [84](#)
- Michels, P. A., Villafraz, O., Pineda, E., Alencar, M. B., Cáceres, A. J., Silber, A. M. and Brin-gaud, F. (2021), 'Carbohydrate metabolism in trypanosomatids : new insights revealing novel complexity, diversity and species-unique features', Experimental Parasitology p. 108102. [17](#)
- Mkunza, F., Olaho, W. M. and Powell, C. N. (1995), 'Partial protection against natural trypano-somiasis after vaccination with a flagellar pocket antigen from Trypanosoma brucei rhode-siense', Vaccine **13**(2), 151–154.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0264410X9593128V> [43](#)
- Moloo, S., Kabata, J., Gitire, N. et al. (2000), 'Study on the mechanical transmission by tsetse fly glossina morsitans centralis of trypanosoma vivax, t. congolense or t. brucei brucei to goats.', Acta tropica **74**(1), 105–108. [12](#), [31](#)
- Motloang, M., Mans, B., Latif, A., Masumu, J. and Van den Bossche, P. (2012), 'Vector compe-tence of glossina austeni and glossina brevipalpis for trypanosoma congolense in kwazulu-natal, south africa', Onderstepoort Journal of Veterinary Research **79**(1), 1–6. [8](#)
- Mugasa, C. M., Schoone, G. J., Ekangu, R. A., Lubega, G. W., Kager, P. A. and Schallig, H. D. F. H. (2008), 'Detection of Trypanosoma brucei parasites in blood samples using real-time nucleic acid sequence-based amplification', Diagnostic Microbiology and Infectious Disease **61**(4), 440–445.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073288930800196X> [57](#)
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986), Specific enzymatic amplification of dna in vitro : the polymerase chain reaction, in 'Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology', Vol. 51, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 263–273. [55](#)
- Murray, M. (1989), Factors affecting duration and intensity of trypanosome infection of domestic animals, in 'Annales de la Societe belge de medecine tropicale', Vol. 69, pp. 189–196. [35](#)
- Murray, M. and Dexter, T. M. (1988), 'Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review', Acta Trop **45**(4), 389–432. [37](#), [53](#)
- Murray, M., d'Leteren, G. D. M. and Teale, A. J. (2004), Trypanotolerance. Publisher : CABI Publishing.
URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043124855> [36](#)
- Murray, M., D'leteren, G., Authie, E. and Wissocq, N. (1998), 'Trypanotolerance, an option for

- sustainable livestock production in areas at risk from trypanosomosis', OIE Rev. Sci. Tech **17**, 154–175. **8**
- Mwai, O., Hanotte, O., Kwon, Y.-J. and Cho, S. (2015), 'African indigenous cattle : unique genetic resources in a rapidly changing world', Asian-Australasian journal of animal sciences **28**(7), 911. **37**
- Müller, N., Hemphill, A., Imboden, M., Duvallet, G., Dwinger, R. H. and Seebeck, T. (1992), 'Identification and characterization of two repetitive non-variable antigens from African trypanosomes which are recognized early during infection', Parasitology **104**(1), 111–120. Publisher : Cambridge University Press.
URL: <https://doc.rero.ch/record/296916> **77, 80**
- Naessens, J. (2006), 'Bovine trypanotolerance : a natural ability to prevent severe anaemia and haemophagocytic syndrome ?', International journal for parasitology **36**(5), 521–528. **37**
- Nantulya, V. M. (1994), 'Suratex : a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra)', Trop. Med. Parasitol. **45**(1), 9–12. **69**
- Nantulya, V. M. and Lindqvist, K. J. (1989), 'Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. congolense* and *T. brucei* infections in cattle', Trop. Med. Parasitol. **40**(3), 267–272. **69**
- Nantulya, V. M., Musoke, A. J., Rurangirwa, F. R., Saigar, N. and Minja, S. H. (1987), 'Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*', Parasite Immunology **9**(4), 421–431.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3024.1987.tb00520.x> **69**
- Nguyen, T.-T., Zhou, M., Ruttayaporn, N., Nguyen, Q. D., Nguyen, V. K., Goto, Y., Suzuki, Y., Kawazu, S.-i. and Inoue, N. (2014), 'Diagnostic value of the recombinant tandem repeat antigen TeGM6-4r for surra in water buffaloes', Vet. Parasitol. **201**(1-2), 18–23. **147**
- Njiru, Z. K. (2012), 'Loop-Mediated Isothermal Amplification Technology : Towards Point of Care Diagnostics', PLoS Negl Trop Dis **6**(6).
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3383729/> **58, 60**
- Njiru, Z. K., Mikosza, A. S. J., Matovu, E., Enyaru, J. C. K., Ouma, J. O., Kibona, S. N., Thompson, R. C. A. and Ndung'u, J. M. (2008), 'African trypanosomiasis : Sensitive and rapid detection of the sub-genus *Trypanozoon* by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of parasite DNA', International Journal for Parasitology **38**(5), 589–599.
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751907003396> **58**
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. and Hase, T. (2000), 'Loop-mediated isothermal amplification of DNA', Nucleic Acids Res **28**(12), e63.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC102748/> **58**
- Odeniran, P. O., Onifade, A. A., Omolabi, K. F. and Ademola, I. O. (2021), 'Financial losses estimation of african animal trypanosomosis in nigeria : field reality-based model', Tropical Animal Health and Production **53**(1), 1–11. **41, 42**
- Odongo, S., Sterckx, Y. G., Stijlemans, B., Pillay, D., Baltz, T., Muyldermans, S. and Magez, S. (2016), 'An Anti-proteome Nanobody Library Approach Yields a Specific Immunoassay for *Trypanosoma congolense* Diagnosis Targeting Glycosomal Aldolase', PLoS Negl Trop Dis **10**(2), e0004420. **70, 77**

- Ogbadoyi, E. O., Robinson, D. R. and Gull, K. (2003), 'A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes', *Molecular biology of the cell* **14**(5), 1769–1779. [16](#)
- O’Gorman, G. M., Park, S. D., Hill, E. W., Meade, K. G., Coussens, P. M., Agaba, M., Naessens, J., Kemp, S. J. and MacHugh, D. E. (2009), 'Transcriptional profiling of cattle infected with trypanosoma congolense highlights gene expression signatures underlying trypanotolerance and trypanosusceptibility', *BMC genomics* **10**(1), 1–21. [38](#)
- O’Gorman, G. M., Park, S. D., Hill, E. W., Meade, K. G., Mitchell, L. C., Agaba, M., Gibson, J. P., Hanotte, O., Naessens, J., Kemp, S. J. et al. (2006), 'Cytokine mRNA profiling of peripheral blood mononuclear cells from trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with trypanosoma congolense', *Physiological genomics* **28**(1), 53–61. [38](#)
- OIE (2018a), Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Animal Trypanosomosis (including tsetse-transmitted but excluding surra and dourine).
URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/2018/3.04.16_TRYPANOSOMOSIS.pdf [40](#), [66](#)
- OIE (2018b), 'Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. chapter 3.1.21. Trypanosoma evansi infection (surra).'.
URL: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.21_TRYPANO_SURRA.pdf [40](#), [52](#), [61](#), [63](#), [71](#)
- OIE (2018c), Trypanosoma evansi infection (surra), in 'Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for terrestrial animals.', pp. 660–674. [40](#), [61](#), [63](#), [71](#)
- OIE-Terrestrial-Animals-2019 (n.d.), 'Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2019'.
URL: <https://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> [95](#)
- OMS (2020), 'Le Togo est le premier pays africain à mettre fin à la maladie du sommeil comme problème de santé publique'.
URL: <https://www.afro.who.int/fr/news/le-togo-est-le-premier-pays-africain-mettre-fin-la-maladie-du-sommeil-comme-probleme-de-sante> [184](#)
- OMS (2021), 'La Côte d’Ivoire franchit l’étape cruciale d’élimination de la maladie du sommeil en tant que problème de santé publique'.
URL: <https://www.who.int/fr/news/item/25-03-2021-who-validates-cote-d-ivoire-for-eliminating-sleeping-sickness-as-a-public-health-problem> [184](#)
- Opperdoes, F. R. and Borst, P. (1977), 'Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in trypanosoma brucei : the glycosome', *FEBS letters* **80**(2), 360–364.
URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2877%2980476-6> [17](#)
- Ortiz, P. A., Maia da Silva, F., Cortez, A. P., Lima, L., Campaner, M., Pral, E. M., Alfieri, S. C. and Teixeira, M. M. (2009), 'Genes of cathepsin L-like proteases in Trypanosoma rangeli isolates : markers for diagnosis, genotyping and phylogenetic relationships', *Acta Trop* **112**(3), 249–59. [157](#), [181](#)
- Osório, A. L. A. R., Madruga, C. R., Desquesnes, M., Soares, C. O., Ribeiro, L. R. R. and Costa, S. C. G. d. (2008), 'Trypanosoma (duttonella) vivax : its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the new world-a review', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **103**(1), 1–13. [15](#)

- Ouédraogo, D., Ouédraogo-Koné, S., Yougbaré, B., Soudré, A., Zoma-Traoré, B., Mészáros, G., Khayatzaheh, N., Traoré, A., Sanou, M., Mwai, O. A. et al. (2020), 'Population structure, inbreeding and admixture in local cattle populations managed by community-based breeding programs in burkina faso', *Journal of Animal Breeding and Genetics* . 48
- Overath, P. and Engstler, M. (2004), 'Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins : *Trypanosoma brucei* as a model system', *Molecular Microbiology* **53**(3), 735–744. _eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x>.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2958.2004.04224.x> 16
- Paris, J., Murray, M. and McOdimba, F. (1982), 'A comparative evaluation of the parasitological techniques currently available for the diagnosis of african trypanosomiasis in cattle', *Acta tropica* **39**(4), 307—316.
URL: <http://europepmc.org/abstract/MED/6131590> 52, 53
- Payne, W. J. A. and Hodges, J. (1997), *Tropical cattle : origins, breeds and breeding policies*. Publisher : Blackwell Science Ltd.
URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19970105347> 37
- Peacock, L., Cook, S., Ferris, V., Bailey, M. and Gibson, W. (2012), 'The life cycle of *Trypanosoma* (*Nannomonas*) *congolense* in the tsetse fly', *Parasites & Vectors* **5**(1), 109.
URL: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-109> 20, 22
- Peeling, R. W. and Mabey, D. (2014), 'Diagnostics for the control and elimination of neglected tropical diseases', *Parasitology* **141**(14), 1789–1794.
URL: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0031182014000973/type/journal_article 51, 184
- Petitdidier, E., Pagniez, J., Pissarra, J., Holzmuller, P., Papierok, G., Vincendeau, P., Lemesre, J.-L. and Bras-Gonçalves, R. (2019), 'Peptide-based vaccine successfully induces protective immunity against canine visceral leishmaniasis', *npj Vaccines* **4**(1), 1–9. 43
- Pillay, D., Boulange, A. F. and Coetzer, T. H. (2010), 'Expression, purification and characterisation of two variant cysteine peptidases from *Trypanosoma congolense* with active site substitutions', *Protein Expr Purif* **74**(2), 264–71. 160, 187
- Pillay, D., Izotte, J., Fikru, R., Büscher, P., Mucache, H., Neves, L., Boulangé, A., Seck, M. T., Bouyer, J., Napier, G. B., Chevtzoff, C., Coustou, V. and Baltz, T. (2013), 'Trypanosoma vivax GM6 Antigen : A Candidate Antigen for Diagnosis of African Animal Trypanosomosis in Cattle', *PLoS ONE* **8**(10), e78565.
URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0078565> 4, 67, 77, 147
- Pinto Torres, J. E., Goossens, J., Ding, J., Li, Z., Lu, S., Vertommen, D., Naniima, P., Chen, R., Muijldermans, S., Sterckx, Y. G.-J. and Magez, S. (2018), 'Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections', *Scientific Reports* **8**(1).
URL: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-26732-7> 69, 77
- Potts, A., Human, M., Theron, R., Dreyer, M., Olivier, H., Naidoo, P. and Vermeulen, K. (2013), Dourine Complement Fixation Test SOP, Technical report. 65
- Radwanska, M., Büscher, P., de Baetselier, P., Claes, F., Chamekh, M., Vanhamme, L., Pays, E., Magnus, E. and Magez, S. (2002), 'The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*.', *The American Journal of Tropical*

- Medicine and Hygiene **67**(6), 684–690.
URL: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2002.67.684> 56
- Radwanska, M., Guirnalda, P., De Trez, C., Ryffel, B., Black, S. and Magez, S. (2008), 'Trypanosomiasis-Induced B Cell Apoptosis Results in Loss of Protective Anti-Parasite Antibody Responses and Abolishment of Vaccine-Induced Memory Responses', PLoS Pathogens **4**(5), e1000078.
URL: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000078> 25
- Ralston, K. S. and Hill, K. L. (2008), 'The flagellum of trypanosoma brucei : new tricks from an old dog', International journal for parasitology **38**(8-9), 869–884. 15
- Randolph, S. E., Williams, B. G., Rogers, D. J. and Connor, H. (1992), 'Modelling the effect of feeding-related mortality on the feeding strategy of tsetse (diptera : Glossinidae)', Medical and Veterinary Entomology **6**(3), 231–240.
URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1421503/> 31
- Rasooly, R. and Balaban, N. (2004), 'Trypanosome microtubule-associated protein p15 as a vaccine for the prevention of African sleeping sickness', Vaccine **22**(8), 1007–1015.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X03006649> 45
- Rege, J. E. O. (1999), 'The state of African cattle genetic resources I. Classification framework and identification of threatened and extinct breeds', Animal Genetic Resources Information Bulletin . Accepted : 2011-10-16T07 :51 :19Z.
URL: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/10349> 48
- Reifenberg, J.-M., Solano, P., Bauer, B., Kaboré, I., Cuny, G., Duvallet, G. and Cuisance, D. (1997), 'Apport de la technique PCR pour une meilleure compréhension de l'épizootiologie des trypanosomoses bovines : exemple de la zone d'aménagement pastoral de Yalé au Burkina Faso', Revue d'Elevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux .
URL: <https://agritrop.cirad.fr/389296/> 57
- Robinson, D. R., Sherwin, T., Ploubidou, A., Byard, E. H. and Gull, K. (1995), 'Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle.', Journal of Cell Biology **128**(6), 1163–1172. 14
- Robinson, K. A. and Beverley, S. M. (2003), 'Improvements in transfection efficiency and tests of rna interference (rnai) approaches in the protozoan parasite leishmania', Molecular and Biochemical Parasitology **128**(2), 217–228.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166685103000793> 16
- Rodhain, F. and Perez, C. (1985), 'Precis d'entomologie medicale et veterinaire ; notions d'epidemiologie des maladies a vecteurs'. 32
- Roelants, G., Tamboura, I., Sidiki, D., Bassinga, A. and Pinder, M. (1983), 'Trypanotolerance. an individual not a breed character.', Acta tropica **40**(2), 99–104. 37
- Rogé, S., Van Reet, N., Odiwuor, S., Tran, T., Schildermans, K., Vandamme, S., Vandenberghe, I., Vervecken, W., Gillingwater, K., Claes, F., Devreese, B., Guisez, Y. and Büscher, P. (2013), 'Recombinant expression of trypanosome surface glycoproteins in Pichia pastoris for the diagnosis of Trypanosoma evansi infection', Veterinary Parasitology **197**(3-4), 571–579.
URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401713003002> 157
- Rotureau, B. and Van Den Abbeele, J. (2013), 'Through the dark continent : African trypanosome development in the tsetse fly', Front. Cell. Infect. Microbiol. **3**. Publisher : Frontiers.

URL: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2013.00053/full?utm_source=newsletterutm_medium=emailutm_campaign=Microbiology-w40-2013 18, 22

Sánchez, E., Perrone, T., Recchimuzzi, G., Cardozo, I., Biteau, N., Aso, P. M., Mijares, A., Baltz, T., Berthier, D., Balzano-Nogueira, L. et al. (2015), 'Molecular characterization and classification of trypanosoma spp. venezuelan isolates based on microsatellite markers and kinetoplast maxicircle genes', Parasites & vectors **8**(1), 1–11. 27

Sawitri, D. H., Wardhana, A. H., Sadikin, M. and Wibowo, H. (2019), 'Detection of Surra (trypanosomiasis) positivity in humans in an outbreak area of Indonesia', Medical Journal of Indonesia **28**(2), 196–202. Number : 2.

URL: <https://mji.ui.ac.id/journal/index.php/mji/article/view/1767> 63

Schell, D., Evers, R., Preis, D., Ziegelbauer, K., Kiefer, H., Lottspeich, F., Cornelissen, A. W. and Overath, P. (1991), 'A transferrin-binding protein of Trypanosoma brucei is encoded by one of the genes in the variant surface glycoprotein gene expression site.', The EMBO Journal **10**(5), 1061–1066. Publisher : John Wiley & Sons, Ltd.

URL: <https://www.embopress.org/doi/abs/10.1002/j.1460-2075.1991.tb08045.x> 75

Schell, D., Stierhof, Y.-D. and Overath, P. (1990), 'Purification and characterization of a tartrate-sensitive acid phosphatase of Trypanosoma brucei', FEBS Letters **271**(1-2), 67–70. _eprint : <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1016/0014-5793%2890%2980373-Q>.

URL: <https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1016/0014-5793%2890%2980373-Q> 75

Schoening, H. W. (1924), 'Trypanosomiasis in Camels : Its Detection by Complement Fixation', The Journal of Infectious Diseases **34**(6), 608–613.

URL: <http://www.jstor.org/stable/30083169> 65

Shaw, A. (2009), 'Assessing the economics of animal trypanosomosis in africa-history and current perspectives', Onderstepoort Journal of Veterinary Research **76**(1), 27–32. 42

Shaw, A. P. (2004), '20 economics of african trypanosomiasis', The trypanosomiasis p. 369. 2

Shinnick, T. M. (1990), 'Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens.', Heat shock proteins and immune response. pp. 145–160.

URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19910870298> 159

Sidibe, I. (1996), Variabilité génétique de Trypanosoma congolense, agent de la trypanosomose animale : implications taxonomiques et épidémiologiques, PhD thesis, Thèse doct., Université de Montpellier II, France.

URL: <https://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010008173> 11

Silva Pereira, S., Trindade, S., De Niz, M. and Figueiredo, L. M. (2019), 'Tissue tropism in parasitic diseases', Open Biol **9**(5), 190036. 11, 12, 13, 61, 162

Silva, S., Pardee, K. and Pena, L. (2019), 'Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for the Diagnosis of Zika Virus : A Review', Viruses **12**(1). 58, 59, 60

Silverman, J. M., Chan, S. K., Robinson, D. P., Dwyer, D. M., Nandan, D., Foster, L. J. and Reiner, N. E. (2008), 'Proteomic analysis of the secretome of Leishmania donovani', Genome Biol **9**(2), R35.

URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-r35> 181

Simarro, P. P., Diarra, A., Postigo, J. A. R., Franco, J. R. and Jannin, J. G. (2011), 'The human

- african trypanosomiasis control and surveillance programme of the world health organization 2000–2009 : the way forward', *PLoS Negl Trop Dis* **5**(2), e1007. [11](#)
- Simo, G., Njiokou, F., Tume, C., Lueong, S., De Meeûs, T., Cuny, G. and Asonganyi, T. (2010), 'Population genetic structure of central african trypanosoma brucei gambiense isolates using microsatellite dna markers', *Infection, Genetics and Evolution* **10**(1), 68–76. [18](#)
- Smith, T. K., Bringaud, F., Nolan, D. P. and Figueiredo, L. M. (2017), 'Metabolic reprogramming during the trypanosoma brucei life cycle', *F1000Research* **6**. [17](#)
- Solano, P., Duvallet, G., Dumas, V., Cuisance, D. and Cuny, G. (1997), 'Microsatellite markers for genetic population studies in glossina palpalis (diptera : Glossinidae)', *Acta tropica* **65**(3), 175–180. [12](#)
- Solano, P., Sidibe, I. and Rotureau, B. (2018), Les glossines (Diptera : Glossinidae), in D. Fontenille, G. Duvallet and V. Robert, eds, 'Entomologie médicale et vétérinaire', number chap. 15, IRD Editions, pp. 367–389.
URL: <https://hal-pasteur.archives-ouvertes.fr/pasteur-02006256> [29](#), [30](#), [49](#), [50](#)
- Somda, M. B., Bengaly, Z., Dama, E., Poinsignon, A., Dayo, G.-K., Sidibe, I., Remoue, F., Sanon, A. and Bucheton, B. (2013), 'First insights into the cattle serological response to tsetse salivary antigens : A promising direct biomarker of exposure to tsetse bites', *Veterinary parasitology* **197**(1-2), 332–340. [31](#), [80](#)
- Songa, E. B. and Hamers, R. (1988), A card agglutination test (CATT) for veterinary use based on an early VAT RoTat 1/2 of Trypanosoma evansi, Vol. 68, pp. 233–240. Issue : 3. [62](#)
- Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K. (2005), 'Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of escherichia coli', *Microbial cell factories* **4**(1), 1–8. [159](#)
- Soria-Guerra, R. E., Nieto-Gomez, R., Govea-Alonso, D. O. and Rosales-Mendoza, S. (2015), 'An overview of bioinformatics tools for epitope prediction : Implications on vaccine development', *Journal of Biomedical Informatics* **53**, 405–414.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1532046414002330> [84](#)
- Spinks, D., Shanks, E. J., Cleghorn, L. A. T., McElroy, S., Jones, D., James, D., Fairlamb, A. H., Frearson, J. A., Wyatt, P. G. and Gilbert, I. H. (2009), 'Investigation of Trypanothione Reductase as a Drug Target in Trypanosoma brucei', *ChemMedChem* **4**(12), 2060–2069. _eprint : <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/cmdc.200900262>.
URL: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cmdc.200900262> [48](#)
- Stephens, J. W. W., Fantham, H. B. and Ross, R. (1910), 'On the peculiar morphology of a trypanosome from a case of sleeping sickness and the possibility of its being a new species (T. rhodesiense)', *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character* **83**(561), 28–33. Publisher : Royal Society.
URL: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rspb.1910.0064> [7](#)
- Stevens, J. R. and Brisse, S. (2004), Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance., in I. Maudlin, P. H. Holmes and M. A. Miles, eds, 'The trypanosomiasis', CABI, Wallingford, pp. 1–23.
URL: <http://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20043124834> [8](#), [10](#), [11](#), [12](#), [13](#)
- Steverding, D. (2008), 'The history of African trypanosomiasis', *Parasit Vectors* **1**, 3.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2270819/> [8](#)

- Steverding, D. (2010), 'The development of drugs for treatment of sleeping sickness : a historical review', *Parasites Vectors* **3**(1), 15.
URL: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-15> 46
- Stuart, K. D., Schnauffer, A., Ernst, N. L. and Panigrahi, A. K. (2005), 'Complex management : Rna editing in trypanosomes', *Trends in biochemical sciences* **30**(2), 97–105. 27
- Sullivan, L., Wall, S. J., Carrington, M. and Ferguson, M. A. J. (2013), 'Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for Human African Trypanosomiasis and Generation of a Prototype Lateral Flow Immunodiagnostic Device', *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7**(2), e2087. Publisher : Public Library of Science.
URL: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002087> 74, 83
- Sutcliffe, O. B., Skellern, G. G., Araya, F., Cannavan, A., Sasanya, J. J., Dungu, B., van Gool, F., Münstermann, S. and Mattioli, R. C. (2014), 'Animal trypanosomosis : making quality control of trypanocidal drugs possible', *Rev Sci Tech* **33**(3), 813–830. 47
- Taylor, K. A. (1998), 'Immune responses of cattle to African trypanosomes : protective or pathogenic?', *International Journal for Parasitology* **28**(2), 219–240.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0020751997001549> 25
- Taylor, K. and Authié, E. M.-L. (2004), Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In *The Trypanosomiasis* (ed. Maudlin, I., Holmes, P. H. and Miles, M. A.), in 'The Trypanosomiasis', cab international, wallingford, uk. edn, pp. pp. 331–353. 2, 3, 13, 14, 34, 35, 36, 39
- Tehseen, S., Jahan, N., Qamar, M. F., Desquesnes, M., Shahzad, M. I., Deborggraeve, S. and Büscher, P. (2015), 'Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan', *Parasites & Vectors* **8**(1).
URL: <http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/415> 64
- Terpe, K. (2006), 'Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production : from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems', *Applied microbiology and biotechnology* **72**(2), 211–222. 159
- Thuy, N. T., Goto, Y., Lun, Z.-R., Kawazu, S.-I. and Inoue, N. (2012), 'Tandem repeat protein as potential diagnostic antigen for *Trypanosoma evansi* infection', *Parasitol Res* **110**(2), 733–739.
URL: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2632-9> 77
- Tihon, E., Imamura, H., Dujardin, J.-C., Van Den Abbeele, J. and Van den Broeck, F. (2017), 'Discovery and genomic analyses of hybridization between divergent lineages of *trypanosoma congolense*, causative agent of animal african trypanosomiasis', *Molecular ecology* **26**(23), 6524–6538. 18
- Tizard, I., Nielsen, K. H., Seed, J. R. and Hall, J. E. (1978), 'Biologically active products from African Trypanosomes.', *Microbiol Rev* **42**(4), 664–681.
URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC281451/> 35, 78, 162
- Toukara, M., Boulangé, A., Bringaud, F., Thonnus, M., Belem, A., Bengaly, Z., Thevenon, S., Berthier, D. and Rivière, L. (2021), 'Les méthodes de diagnostic des trypanosomiasis animales africaines : avantages, limites et nouvelles pistes d'amélioration', *Bulletin de l'Association des Anciens Elèves de l'Institut Pasteur* **63**(242), 31–38.
URL: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-03225173> 3, 4, 188
- Traore-Leroux, T., Fumoux, F. and Pinder, M. (1987), 'High density lipoprotein levels in the

- serum of trypanosensitive and trypanoresistant cattle. changes during trypanosoma congolense infection.', Acta tropica **44**(3), 315–323. **36**
- Truc, P., Aerts, D., McNamara, J. J., Claes, Y., Allingham, R., Le Ray, D. and Godfrey, D. G. (1992), 'Direct isolation in vitro of Trypanosoma brucei from man and other animals, and its potential value for the diagnosis of gambian trypanosomiasis', Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene **86**(6), 627–629.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0035920392901589> **54**
- Uilenberg, G. (1998), 'A field guide for THE DIAGNOSIS, TREATMENT AND PREVENTION OF AFRICAN ANIMAL TRYPANOSOMIASIS'.
URL: <http://www.fao.org/3/X0413E/X0413E00.htm> **8, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 61, 63, 66, 69**
- Van den Bossche, P., de La Rocque, S., Hendrickx, G. and Bouyer, J. (2010), 'A changing environment and the epidemiology of tsetse-transmitted livestock trypanosomiasis', Trends in parasitology **26**(5), 236–243. **30**
- Van der Waaij, E., Hanotte, O., van Arendonk, J. A., Kemp, S. J., Kennedy, D., Gibson, J. P. and Teale, A. (2003), 'Population parameters for traits defining trypanotolerance in an f2 cross of n'dama and boran cattle', Livestock Production Science **84**(3), 219–230. **37, 38**
- Vaughan, S. and Gull, K. (2003), 'The trypanosome flagellum', Journal of Cell Science **116**(5), 757–759. **15**
- Verlinde, C. L. M. J., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Périé, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G. J. and Michels, P. A. M. (2001), 'Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs', Drug Resistance Updates **4**(1), 50–65.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1368764600901778> **48**
- Verloo, D., Brandt, J., Van Meirvenne, N. and Büscher, P. (2000), 'Comparative in vitro isolation of trypanosoma theileri from cattle in belgium', Veterinary parasitology **89**(1-2), 129–132. **54**
- Verloo, D., Magnus, E. and Büscher, P. (2001), 'General expression of RoTat 1.2 variable antigen type in Trypanosoma evansi isolates from different origin', Vet Parasitol **97**(3), 183–189. **64**
- Vickerman, K. (1969), 'The Fine Structure of Trypanosoma congolense in Its Bloodstream Phase', The Journal of Protozoology **16**(1), 54–69. eprint : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02233.x>.
URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1550-7408.1969.tb02233.x> **15, 16, 23**
- Vickerman, K., Myler, P. J. and Stuart, K. D. (1993), 'African trypanosomiasis.', Immunology and molecular biology of parasitic infections. (Ed. 3), 170–212. Publisher : Blackwell Scientific Publications Ltd.
URL: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19930807462> **14, 15, 16**
- Vreysen, M. J., Seck, M. T., Sall, B. and Bouyer, J. (2013), 'Tsetse flies : their biology and control using area-wide integrated pest management approaches', Journal of invertebrate pathology **112**, S15–S25. **2, 3, 30, 49, 50**
- Wellde, B., Löttsch, R., Deindl, G., Sadun, E., Williams, J. and Warui, G. (1974), 'Trypanosoma congolense : I. clinical observations of experimentally infected cattle', Experimental parasitology **36**(1), 6–19. **88**

- WHO (2013), Control and surveillance of human African trypanosomiasis : report of a WHO expert committee, World Health Organization. Accepted : 2013-11-27T13 :42 :13Z ISSN : 0512-3054.
URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/95732> 57
- WHO (2020), 'Human african trypanosomiasis (number of new reported cases of human african trypanosomiasis in 2019)'.
URL: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/hat/hat.html 11
- Wickstead, B., Ersfeld, K. and Gull, K. (2004), 'The small chromosomes of trypanosoma brucei involved in antigenic variation are constructed around repetitive palindromes', Genome research **14**(6), 1014–1024. 26
- Woo, P. T. (1970), 'The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis', Acta Trop. **27**(4), 384–386. 53
- Wrightsmann, R. A. and Manning, J. E. (2000), 'Parafagellar rod proteins administered with alum and IL-12 or recombinant adenovirus expressing IL-12 generates antigen-specific responses and protective immunity in mice against Trypanosoma cruzi', Vaccine **18**(14), 1419–1427.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X99003801> 45
- Xia, Y., Guo, X.-G. and Zhou, S. (2014), 'Rapid detection of Streptococcus pneumoniae by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification', J Thorac Dis **6**(9), 1193–1199. 58
- Young, R. A. and Davis, R. W. (1983), 'Efficient isolation of genes by using antibody probes', PNAS **80**(5), 1194–1198. Publisher : National Academy of Sciences Section : Research Article.
URL: <https://www.pnas.org/content/80/5/1194> 79, 80
- Ziegelbauer, K. and Overath, P. (1992), 'Identification of invariant surface glycoproteins in the bloodstream stage of Trypanosoma brucei.', Journal of Biological Chemistry **267**(15), 10791–10796.
URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925819500886> 74, 181

Annexes

Annexe 1 : Mélanges réactionnels et programmes de la PCR avec différentes polymérases.

Date	
Mix pour	16
Vol final μ l	25
Nb Echantillons	2
PCR différentes	2
DMSO % final	0

Mix général	[initiale]	μ l	Mix pour 16 (μ l)	[finale]
Tp Green GoTaq	5 X	5	80	1 X
dNTP	10 mM	0,5	8	0,2 mM
Oligo1	10 μ M	0,625		0,25 μ M
Oligo2	10 μ M	0,625		0,25 μ M
GoTaq-G2	5 U/ μ l	0,25	4	0,05 U'
ADN échantillon		1		0,5 ng
H2O milliQ		17	272	
Total volume μl			364	

Système / PCR	μ l de mix	22,75	
Oligo1 /syst PCR	μ l	0,63	
Oligo2/ syst PCR	μ l	0,63	
Total	μ l	24,00	
μ l par tube	μ l	24,00	

Template (μ L)	1
---------------------	---

Etape du cycle	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	1
Dénaturation	95°C	30 secondes	
Hybridation	58°C	30 secondes	35
Extension	72°C	0,5 min	
Extension finale	72°C	5 minutes	
Conservation	4°C	5 minutes	

Date	
Mix pour	3
Vol final μ l	50
Nb Echantillons	3
PCR différentes	3
DMSO % final	0

Mix général	[initiale]		μ l	Mix pour 3 (μ l)	[finale]	
Tp Pfu w 20 mM MgSO4	10	X	5	15	1	X
dNTP	10	mM	1	3	0,2	mM
Oligo1	100	μ M	0,4		0,8	μ M
Oligo2	100	μ M	0,4		0,8	μ M
Pfu	5	U'/ μ l	0,5	1,5	0,05	U'
ADN échantillon			1		2	ng
H2O milliQ			41,7	125,1		
Total volume μl				144,6		

Système / PCR	μ l de mix	48,20	
Oligo1 /syst PCR	μ l	0,40	
Oligo2/ syst PCR	μ l	0,40	
Total	μ l	49,00	+
μ l par tube	μ l	49	Template (μ L)
			1

Etape du cycle	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	1
Dénaturation	95°C	30 secondes	
Hybridation	58°C	30 secondes	35
Extension	72°C	2,5 minutes	
Extension finale	72°C	5 minutes	
Conservation	4°C	5 minutes	

Date	
Mix pour	7
Vol final μ l	50
Nb Echantillons	2
PCR différentes	3

Composant	Initiale	Finale	25 μ l REACTION	50 μ l REACTION	Mix pour 7
Q5 Reaction Buffer	5 X	1 X	5	10	70
dNTPs	10 mM	200 μ M	0,5	1	7
Forward Primer	10 μ M	0,5 μ M	1,25	2,5	
Reverse Primer	10 μ M	0,5 μ M	1,25	2,5	
Q5 High-Fidelity DNA Pol ^h	20 U/ μ L	0,02 U/ μ L	0,25	0,5	4
Q5 High GC Enhancer (op	5 X	1 X	5	10	70
Template DNA	58 ng/ μ L	0,5 ng	0,22	0,43	
H ₂ O nuclease free			11,53	23	161
Total				50	312

Système / PCR	μ l de mix	44,57	89,14
Oligo1 /syst PCR	μ l	2,50	5
Oligo2/ syst PCR	μ l	2,50	5
Total	μ l	49,57	99,14
μ l par tube	μ l		49,57

Template (μ L)	0,43
---------------------	------

Etape du cycle	Dénaturation initiale	Dénaturation	hybridation	Extension	Extension finale	Conservation
Température	95°C	95°C	58°C	72°C	72°C	4°C
Temps	30 sec	10 sec	15 sec	30 sec	10 min	5 min
Cycles	1		35			

Annexe 2 : PCR sur colonie unique pour la sélection de clones positifs à la suite du clonage d'un gène.

Date	
Mix pour	40
Vol final μ l	12,5
Nb Echantillons	2
PCR différentes	2
DMSO % final	0

Piquer une colonie et faire resuspendre dans 5 μ L d'H₂O distillée stérile dans 1 puit d'une plaque 96 puits. Ajouter 1 μ L de cette suspension au mix de la PCR. Ensuite conserver reste de la suspension à 37°C pendant de la PCR.

Mix général	[initiale]	μ l	Mix pour 16 (μ l)	[finale]		
Tp Green GoTaq	5	X	2,5	100	1	X
dNTP	10	mM	0,25	10	0,2	mM
Oligo1	10	μ M	0,3125		0,25	μ M
Oligo2	10	μ M	0,3125		0,25	μ M
GoTaq-G2	5	U'/ μ L	0,125	5	0,05	U'
Colonie resuspendue			1		0,5	ng
H ₂ O milliQ			8	320		
Total volume μl				435		

Système / PCR	μ l de mix	10,88	
Oligo1 /syst PCR	μ l	0,31	
Oligo2/ syst PCR	μ l	0,31	
Total	μ l	11,50	
μ l par tube	μ l	11,50	+ Colonie (μ L) 1

Etape du cycle	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	95°C	5 minutes	1
Dénaturation	95°C	30 secondes	
Hybridation	58°C	30 secondes	35
Extension	72°C	0,5 min	
Extension finale	72°C	5 minutes	
Conservation	4°C	5 minutes	

Etaler les colonies positives sur milieu LB solide à 37°C.

Annexe 3 : Mélanges réactionnels pour la digestion enzymatique par les enzymes de restriction et pour la ligation d'un insert dans un plasmide linéarisé.

Digestion de clonage		Echantillon	Nom	ng/μL				
		Produit PCR		30				
		Vecteur		200				
		Produit PCR			Vecteur			
		Enzyme 1	EcoRI		Enzyme 1		EcoRI	
		Enzyme 2	XhoI		Enzyme 2		XhoI	
		Mix de réaction			Mix de réaction			
		50 μL reaction			50 μL reaction			
		Composant	Initiale	Finale	Composant	Initiale	Finale	μL
		ADN	30 ng/μL	1000 ng	ADN	200 ng/μL	1000 ng	5,00
		Tampon de double digestion	10 X	1 X	Tampon de double digestion	10 X	1 X	5
		EcoRI	20 U/μL	10 U	EcoRI	20 U/μL	10 U	0,5
		XhoI	20 U/μL	10 U	XhoI	20 U/μL	10 U	0,5
		H ₂ O nuclease free		10,67	H ₂ O nuclease free			39,00
Ligation		Fragment-Vecteur						
Ratio sur NEBioCalculator		Ratio Insert : Plasmide	3:1					
		Plasmide	pETSUMO	20 ng				
		Insert	TvCAT	256 ng				
		Mix de réaction						
		20 μL reaction						
		Composant	Initiale	Finale				
		T4 DNA ligase						
		Rapid ligation buffer	2 X	1 X				
		Plasmide	50 ng/μL	20 ng				
		Insert	60 ng/μL	255,5 ng				
		H ₂ O nuclease free		4,34				
		Concentration après digestion						
		Plasmide		50 ng/μL				
		Insert		60 ng/μL				

Annexe 4 : Protocole expérimental de spectrométrie de masse en tandem pour l'identification de protéines du sécrétome de *T. congolense*.

Jean-William Dupuy (ORCID ID : 0000-0002-2448-4797)

Univ. Bordeaux, Plateforme Protéome, 33000, Bordeaux, France.

Proteomic analysis

Three independent biological replicates of 1×10^8 *T. congolense* cells were harvested by centrifugation (10 min, 1800 rpm, 4°C). Supernatants were filtered with (0.45 µm), then concentrated 50-fold by centrifugation on size exclusion columns (Pierce™ Protein Concentrator PES, 10K MWCO). Secretoma samples were boiled for 4 min with Laemmli sample buffer and were loaded on a 10% acrylamide SDS-PAGE gel. Proteins were visualized by Colloidal Blue staining. Migration was stopped when samples had just entered the resolving gel and the unresolved region of the gel was cut into only one segment. Finally, each SDS-PAGE band was cut into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3), 50% Acetonitrile (ACN) and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were dried at room temperature. Proteins were first reduced in 10 mM dithiothreitol, 100 mM NH_4HCO_3 for 30 min at 56°C then alkylated in 100 mM iodoacetamide, 100 mM NH_4HCO_3 for 30 min at room temperature and shrunk in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were rehydrated with 50 mM NH_4HCO_3 for 10 min at room temperature. Before protein digestion, gel pieces were shrunk in ACN for 10 min and dried at room temperature. Proteins were digested by incubating each gel slice with 10 ng/µl of trypsin (V5111, Promega) in 40 mM NH_4HCO_3 , 10% ACN, rehydrated at 4°C for 10 min, and finally incubated overnight at 37°C. The resulting peptides were extracted from the gel by three steps: a first incubation in 40 mM NH_4HCO_3 , 10% ACN for 15 min at room temperature and two incubations in 47.5% ACN, 5% formic acid for 15 min at room temperature. The three collected extractions were pooled with the initial digestion supernatant, dried in a SpeedVac, and resuspended with 0.1% formic acid for a final concentration of 0.05 µg/µL. NanoLC-MS/MS analysis were performed using an Ultimate 3000 RSLC Nano-UPHLC system (Thermo Scientific, USA) coupled to a nanospray Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™ Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, California, USA). Each peptide extracts were loaded on a 300 µm ID x 5 mm PepMap C₁₈ precolumn (Thermo Scientific, USA) at a flow rate of 10 µL/min. After a 3 min desalting step, peptides were separated on a 50 cm EasySpray column (75 µm ID, 2 µm C₁₈ beads, 100 Å pore size, ES803, Thermo Fisher Scientific) with a 4-40% linear gradient of solvent B (0.1% formic acid in 80% ACN) in 58 min. The separation flow rate was set at 300 nL/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode

at a 2.0 kV needle voltage. Data was acquired using Xcalibur 4.1 software in a data-dependent mode. MS scans (m/z 375-1500) were recorded at a resolution of R = 120000 (@ m/z 200) and an AGC target of 4×10^5 ions collected within 50 ms, followed by a top speed duty cycle of up to 3 seconds for MS/MS acquisition. Precursor ions (2 to 7 charge states) were isolated in the quadrupole with a mass window of 1.6 Th and fragmented with HCD@30% normalized collision energy. MS/MS data was acquired in the ion trap with rapid scan mode, AGC target of 3×10^3 ions and a maximum injection time of 300 ms. Selected precursors were excluded for 60 seconds. Protein identification and Label-Free Quantification (LFQ) were done in Proteome Discoverer 2.4. MS Amanda 2.0, Sequest HT and Mascot 2.4 algorithms were used for protein identification in batch mode by searching against a *Trypanosoma congolense* strain IL 3000 protein database (11 585 entries, release 50). This database was downloaded from <http://tritrypdb.org> website. Two missed enzyme cleavages were allowed for the trypsin. Mass tolerances in MS and MS/MS were set to 10 ppm and 0.6 Da. Oxidation (M) and, acetylation (K) were searched as dynamic modifications and carbamidomethylation (C) as static modification. Peptide validation was performed using Percolator algorithm [2] and only “high confidence” peptides were retained corresponding to a 1% false discovery rate at peptide level. Minora feature detector node (LFQ) was used along with the feature mapper and precursor ions quantifier. The normalization parameters were selected as follows : (1) Unique peptides (2) Precursor abundance based on intensity (3) Normalization mode : total peptide amount (4) Protein abundance calculation : summed abundances (5) Protein ratio calculation : pairwise ratio based and (6) Hypothesis test : t-test (background based). Quantitative data were considered for master proteins, quantified by a minimum of 2 unique peptides, a fold changes above 2 and a statistical p-value lower than 0.05. The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [3] partner repository with the dataset identifier PXD000000.

LES MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DES TRYPANOSOMIASES ANIMALES AFRICAINES : AVANTAGES, LIMITES ET NOUVELLES PISTES D'AMÉLIORATION

Magamba TOUNKARA^{1,2,3,4,5*}, Alain BOULANGÉ^{2,3,4}, Frédéric BRINGAUD¹, Magali THONNUS¹,
Adrien Marie Gaston BELEM⁶, Zakaria BENGALY⁵, Sophie THÉVENON^{2,3}, David BERTHIER^{2,3}, Loïc RIVIÈRE¹

Résumé

Les trypanosomiasés animales d'origine africaine représentent typiquement la maladie tropicale négligée. Elles sont causées par des parasites sanguicoles du genre *Trypanosoma* transmis par des insectes hématophages, de manière cyclique par les mouches tsé-tsé pour *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* et *T. brucei brucei*, qui causent la nagana, de manière mécanique pour *T. evansi*, agent de la surra, et enfin par transmission sexuelle pour *T. equiperdum*, qui cause la dourine. La nagana est présente dans 38 pays d'Afrique subsaharienne où elle peut affecter de nombreuses espèces animales, sauvages et domestiques. Près de 55 millions de bovins vivent sous risque trypanosomien, sans compter les petits ruminants. Ces maladies détériorent la condition physique de l'animal, induisant une forte baisse de productivité. Dans les cas les plus sévères, et en l'absence de traitement, la mort survient en quelques semaines. L'impact socio-économique est estimé à 4,75 milliards de dollars de pertes annuelles, ce qui fait de ces maladies l'un des obstacles majeurs au développement de l'élevage en Afrique. Le contrôle de ces maladies se heurte à l'absence de vaccin, à des traitements dont les molécules sont peu nombreuses et contre lesquelles se développent de plus en plus de résistances de la part des parasites, et enfin à un diagnostic, moléculaire ou sérologique, dont la robustesse demande à être grandement améliorée. Les signes cliniques ne sont pas spécifiques, le diagnostic parasitologique est souvent peu sensible, et les méthodes moléculaires ne sont pas applicables sur le terrain. Les méthodes d'immunodiagnostic sous forme de tests de diagnostic rapide sont les seules adaptées au terrain, mais les rares tests existants sont très peu accessibles (disponibilité, prix), et manquent de spécificité et/ou de sensibilité. Ici, nous traiterons des limites et des avantages comparatifs des méthodes actuelles de diagnostic et proposerons de nouvelles pistes d'amélioration de ces dernières pour un meilleur contrôle de la maladie.

Mots-Clés : Diagnostic, trypanosomiase animale africaine, *Trypanosoma*

DIAGNOSIS OF ANIMAL AFRICAN TRYPANOSOMIASES

Abstract

The animal trypanosomiasés of African origin are a rather typical example of a neglected tropical disease. They are caused by blood parasites of the *Trypanosoma* genus transmitted by haematophagous insects, cyclically by tsetse flies for *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei brucei*, which cause nagana, mechanically by *T. evansi*, the agent of surra, and finally by *T. equiperdum*, adapted to sexual transmission, which causes dourine. Nagana affects 38 African countries in the sub-Saharan region with 55 million cattle at risk, not counting small ruminants. These diseases deteriorate the animal's physical condition, leading to a sharp drop in productivity; in the most severe cases, and in the absence of treatment, the animal dies within a few weeks. The socio-economic impact is estimated at US\$ 4.75 billion in annual losses, making these diseases one of the major obstacles to livestock development in Africa. The control of these diseases is hampered by the lack of vaccines, a handful of molecules for treatment against which parasites are increasingly developing resistance, and finally, molecular or serological diagnostics whose robustness needs to be greatly improved. Clinical signs are not specific, parasitological diagnosis is often not very sensitive, and molecular methods are not applicable in the field. Immunodiagnostic methods in the form of rapid diagnostic tests are the only ones suitable for the field, but the few existing tests are poorly available and lack specificity and/or sensitivity. Here we address the advantages and limitations of current diagnostic methods and propose new ways of improving them for better disease control.

Keywords: Diagnosis, animal African trypanosomiasis, *Trypanosoma*

Les trypanosomiasés sont des maladies parasitaires qui affectent les humains ainsi que les animaux domestiques et sauvages. Elles sont causées par des parasites appartenant au genre *Trypanosoma* qui sont transmis principalement par des insectes hématophages. Chez l'homme, *Trypanosoma brucei gambiense*

et *T. b. rhodesiense* sont responsables de la trypanosomiase humaine africaine (THA) ou maladie du sommeil. Chez les animaux, les trypanosomes causent plusieurs maladies : surra, dourine et nagana. La nagana ou trypanosomiase animale africaine (TAA) est transmise par la mouche tsé-tsé (ou glossine)

¹ Université de Bordeaux, CNRS, Microbiologie Fondamentale et Pathogénicité, UMR 5234, 33000 Bordeaux, France.

² CIRAD, UMR INTERTRYP, 34398 Montpellier, France.

³ INTERTRYP, Université de Montpellier, CIRAD, IRD, Montpellier, France.

⁴ CIRAD, UMR INTERTRYP, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

⁵ Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

⁶ Université Nazi Boni (UNB), 01 BP 1091, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

* Correspondance : magamba.toukara@gmail.com, Université de Bordeaux, UMR 5234, 146 rue Léo Saignat - Bâtiment 3A 1er étage, 33076 Bordeaux Cedex, France, Tél. +33 5 57 57 16 44.

Tableau I. Caractéristiques des trypanosomiasés animales africaines [12, 43].

Trypanosomes	Vecteur	Distribution	Maladie	Préférence d'hôtes	Signes cliniques
<i>T. congolense</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne	Nagana	Bovins, petits ruminants (mouton, chèvre), cheval, chien, porc, sanglier	Anémie* , pyrexie, gonflements des ganglions lymphatiques et de la rate, ataxie, léthargie, cachexie* , œdèmes, immunosuppression, avortement et symptômes neurologiques
<i>T. vivax</i>	<i>Glossina sp.</i> , tabanidés et stomoxes	Afrique subsaharienne, Amérique latine		Bovins, chameau, petits ruminants (mouton, chèvre), cheval, buffle	
<i>T. b. brucei</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Bovins, petits ruminants, chameau, cheval , âne, chien, chat, porc, sanglier	
<i>T. suis</i> , <i>T. godfreyi</i> , <i>T. simiae</i>	<i>Glossina sp.</i>	Afrique subsaharienne		Porc	
<i>T. evansi</i>	Tabanidés et stomoxes	Afrique subsaharienne, Afrique du Nord, Amérique latine et Asie	Surra	Chameau, cheval , petits ruminants, chameau de Bactriane , bovins, porc, chien et animaux sauvages (rhinocéros, buffle , chevreuil, sanglier, éléphant d'Asie)	
<i>T. equiperdum</i>	Transmission vénérienne	Monde entier	Dourine	Équidés (cheval , âne et mulet)	

Les animaux marqués en gras sont les plus affectés par l'espèce de trypanosomes. * Signes cliniques majeurs.

et est principalement causée par *T. congolense* et *T. vivax*, et dans une moindre mesure par *T. b. brucei*. C'est une maladie dévastatrice du bétail qui touche 38 pays africains de la région subsaharienne. Près de 55 millions de bovins sur une superficie de 10 millions de km² sont menacés [12, 14, 20]. Elle est endémique dans toutes les régions où la mouche tsé-tsé est présente. La surra est causée par *T. evansi* et est transmise par des vecteurs mécaniques tels les tabanidés et les stomoxes [12]. Quant à la dourine causée par *T. equiperdum*, elle est transmise de manière vénérienne. Du fait de leur mode de transmission, la surra et la dourine se sont répandues hors de leur zone d'origine, en Afrique du Nord, Asie et Amérique latine. Notons finalement que *T. vivax* peut être également transmis mécaniquement, ce qui explique sa présence en Amérique du Sud.

La plupart des animaux, domestiques comme sauvages, sont affectés à des degrés divers par les trypanosomiasés animales. La préférence d'hôtes est fonction de l'espèce de trypanosomes (Tableau I). La pathogénicité de la maladie dépend des espèces hôtes, des espèces et souches de trypanosomes ainsi que du statut nutritionnel des animaux [12, 43]. Les signes cliniques sont nombreux, mais non spécifiques. En général, l'anémie est la caractéristique physiologique et la conséquence pathologique la plus importante [43]. Toutefois, d'autres symptômes existent [17, 43] (Tableau I). La détérioration générale de condition des animaux liée à la TAA se traduit par une réduction drastique de la puissance de traction, et de la production de viande et de lait. Ces incidences socio-économiques graves font de la TAA l'une des contraintes majeures au développement de l'élevage en Afrique. Annuellement, près de trois millions de bovins meurent, et 35 millions de doses de trypanocides sont administrées en Afrique subsaharienne. Les pertes économiques dans la zone

endémique sont estimées à 4,75 milliards de dollars américains par an avec plus d'un milliard pour la production bovine [14].

Compte tenu de son importance épidémiologique et de la nécessité d'un choix adéquat pour le traitement, le diagnostic précis de la TAA est indispensable. Cette revue fournit un aperçu de l'ensemble des méthodes utilisées pour le diagnostic des trypanosomiasés animales (nagana, surra et dourine) (Tableau II). L'utilisation des outils moléculaires et sérologiques, notamment les protéines recombinantes et les *nanobodies*, est rapportée. Les nouvelles avancées dans le développement de test de diagnostic rapide (TDR) sont discutées. Enfin, une approche alternative est proposée pour améliorer la sensibilité, la spécificité et la standardisation des antigènes dans le test de diagnostic sérologique par ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*).

1. Les méthodes de diagnostic de la TAA

Actuellement, aucun vaccin contre la TAA n'est disponible. Il constituerait pourtant la méthode de lutte offrant le meilleur rapport coût/efficacité [24]. Cependant, la capacité des trypanosomes à changer régulièrement les protéines de surface de leur manteau glycoprotéique, composé uniquement de VSG (*Variant Surface Glycoprotein*), phénomène connu sous le terme de variation antigénique [18], rend difficile la mise au point d'un vaccin classique. Qui plus est, des études immunologiques ont montré que l'immunosuppression induite par l'infection empêchait le maintien à long terme de cellules mémoires [41], rendant cette approche encore plus aléatoire. Le pilier de la lutte contre la TAA repose donc sur l'utilisation de trypanocides et la lutte antivectorielle (insecticides en pulvérisation (*pour-on*) sur animaux ou par épandage dans l'environnement, piégeage,

Tableau II. Diagnostic des trypanosomiasés animales [10, 35].					
MÉTHODE	PRINCIPE	INDICATIONS			AVANTAGES / DÉFAUTS
		Confirmation de statut	Identification d'espèce	Épidémiologie	
Diagnostic parasitologique : examen microscopique					
Frottis sanguin humide	Une goutte de sang frais entre lame-lamelle	++	Hypothétique (fonction de l'expertise)	+	Simple, rapide, économique / Faible sensibilité
Frottis sanguin fin	Étalement mince de sang, séché, fixé au méthanol et coloré (Giemsa) entre lame-lamelle	+++	Spécificité limitée au sous-genre (d'après la morphologie)	+	Simple et économique / Faible sensibilité, délai
Frottis sanguin épais	Goutte épaisse de sang séché et coloré (Giemsa) entre lame-lamelle	++	Peu spécifique	+	Simple et économique / Faible sensibilité, délai
Technique de Woo	Séparation des composants du sang par centrifugation en tube capillaire hépariné.	+++	Spécificité limitée au sous-genre (très difficile)	++	Peu sensible, rapide, couplé à l'hématocrite / Nécessité de réalisation rapide
Technique de Murray	Centrifugation du sang en tube capillaire hépariné. Examen du <i>buffy coat</i> entre lame-lamelle (en contraste de phase)	+++	Spécificité limitée au sous-genre (d'après la motilité)	+	Sensible / Délicat et dépend de l'expertise
Chromatographie d'échange d'anions	Séparation des trypanosomes des hématies en fonction de leur charge sur colonne de DEAE-cellulose	+	Spécificité limitée au sous-genre	-	Sensibilité élevée, isolement de parasites / Lent et coûteux
Inoculation à l'animal	Injection intrapéritonéale de sang frais à un rongeur immunodéprimé. Analyse de prélèvements au microscope	++	Spécificité limitée à l'espèce ou au sous-genre	-	Sensible / Peu pratique, très coûteux, diagnostic non immédiat, éthique
Diagnostic moléculaire : détection d'ADN					
PCR et dérivés	Amplification de séquence spécifique d'ADN et détection par électrophorèse sur gel d'agarose	++	Spécificité limitée à l'espèce ou au sous-genre	+++	Sensible, applicable à un grand nombre d'échantillons / Coûteux, délai, contamination facile
Diagnostic immunologique : détection des anticorps sériques					
IFAT ¹ (Fig. 3)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgG) par immunofluorescence	++	-	+ ⁵	Sensible / Coûteux, lent, réactions croisées entre espèces
CATT / <i>T. evansi</i> ²	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgM) par agglutination	++	-	+++	Rapide, diagnostic actif / Réactions croisées possibles, faible sensibilité
CFT ³ (Fig. 1)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes par fixation du complément couplée à un système hémolytique	++	- Uniquement <i>T. equiperdum</i>	+	Forte spécificité pour <i>T. equiperdum</i> / Complexe, coûteux, lent, expertise nécessaire, activité anti-complément
ELISA-Ac ⁴ (Fig. 4)	Détection d'anticorps anti-trypanosomes (IgG) par dosage immuno-enzymatique	-	-	+++ ⁶	Sensible, spécifique, standardisable / Réactions croisées, diagnostic non actif, équipements sophistiqués
Trypanolyse (Fig. 2)	Détection d'anticorps anti-VSG par fixation du complément aux complexes immuns lysant les trypanosomes vivants	++	- Spécificité limitée au genre	+	Rapide, diagnostic actif / Réactions croisées possibles, faible sensibilité

¹ Immunofluorescence indirecte ; ² Agglutination sur carte ; ³ Fixation du complément ; ⁴ Immuno-absorption enzymatique ; ⁵ Applicable à petite échelle ; ⁶ Applicable à grande échelle ; +++ Très adapté ; ++ Bien adapté ; + Peu adapté ; - Pas adapté.

écrans imprégnés, stérilisation des mâles) [17]. La détection des parasites est la première étape pour poser le diagnostic de la maladie ou estimer sa prévalence sur le terrain. Actuellement, le diagnostic de la TAA est basé sur différentes méthodes (Tableau II).

1.1. Diagnostic clinique

Les signes cliniques (Tableau I) sont les premiers soupçons d'infection par des trypanosomes chez les bovins. Cependant, aucun n'est spécifique [35], les mêmes signes cliniques en régions endémiques peuvent être retrouvés dans d'autres parasitoses (babésiose, hémochose et theilériose) et dans l'anaplasmose [11, 15]. Cependant, en présence de glossines dans ces zones endémiques de la maladie, les trypanosomiasés sont le plus souvent suspectées lorsque des signes tels que faiblesse, amaigrissement, perte d'appétit, pétéchie conjonctivale ou avortement sont observés.

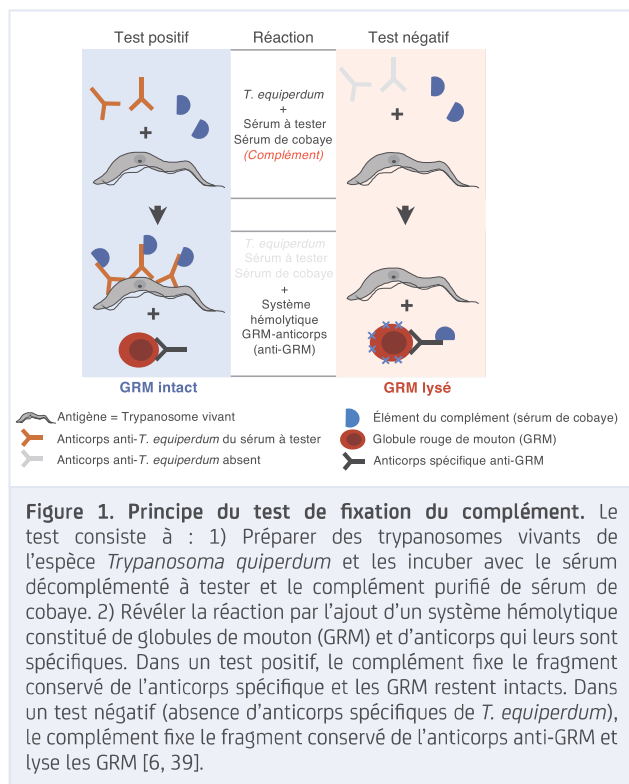
1.2. Diagnostic parasitologique (Tableau II)

En raison de l'absence de symptômes spécifiques, les analyses de laboratoire sont nécessaires au diagnostic étiologique. Il repose sur deux principes : la détection du parasite lui-même (parasitologie) ou de ses constituants (ADN ou protéines), et la détection de la réponse immunitaire de l'hôte (sérologie). La méthode de première ligne est la microscopie [46]. Elle consiste à visualiser directement le parasite dans des échantillons biologiques. Elle est surtout efficace pendant la phase aiguë d'une infection précoce où la parasitémie est élevée. Cependant, l'observation microscopique prend du temps, est très peu sensible en phase chronique, peu fiable pour les infections mixtes, et dépend beaucoup de l'expertise de l'opérateur [46]. Des méthodes de concentration sont nécessaires pour améliorer la sensibilité de l'examen microscopique, en particulier lorsque la parasitémie est faible. L'échantillon est alors enrichi avant examen microscopique par centrifugation en utilisant la technique de Woo, couplée à la détermination de l'hématocrite (*haematocrit centrifugation technique*) [47] ou la technique de Murray (*buffy coat technique*) [35]. Les trypanosomes concentrés à la jonction de la couche leucocytaire et du plasma sont ainsi observés au microscope optique ou en contraste de phase [35]. La chromatographie échangeuse d'anions sur résine de diéthylamino-éthyle (DEAE) est également utilisée pour concentrer et séparer les trypanosomes des éléments figurés du sang à partir d'un échantillon de volume plus important [5]. L'inoculation à des rongeurs de sang d'animaux suspects peut être utilisée lorsqu'une infection est suspectée mais que la parasitémie est indétectable [42], ou encore pour affiner le diagnostic d'espèces ou de sous-espèces de trypanosomes. Cette technique d'amplification du parasite est plus sensible que les méthodes de concentration, mais dépend des espèces de trypanosomes, toutes n'étant pas infectieuses pour les rongeurs. De plus, elle achoppe sur le coût, l'éthique et l'aspect pratique, et le diagnostic n'est pas immédiat [46].

1.3. Diagnostic moléculaire (Tableau II)

Pour les enquêtes épidémiologiques ainsi que l'identification des trypanosomes, les techniques moléculaires ont grandement amélioré la sensibilité par rapport à l'examen parasitologique.

Basées sur la détection de l'ADN du parasite, elles permettent d'identifier les espèces et sous-espèces de trypanosomes dès cinq jours après l'infection aussi bien chez l'insecte que chez l'hôte mammifère [28]. Plusieurs techniques ont été développées. L'utilisation de sondes marquées par un composé radioactif ou chimique a été la première technique employée [46]. Cependant à cause de sa lourdeur, cette technique a été abandonnée il y a bien longtemps. Les méthodes les plus utilisées de nos jours sont l'amplification en chaîne par polymérase (PCR, pour *Polymerase Chain Reaction*) et la qPCR (*quantitative PCR*). Pour ces techniques, un fragment de l'ADN extrait du parasite, situé généralement dans une région répétée et spécifique du génome, est ciblé par un couple d'amorces et amplifié par une polymérase. En fonction de la séquence ciblée, on distingue les PCR multispécifiques (détection d'un fragment commun à tous les trypanosomes) des PCR monospécifiques (détection d'un fragment spécifique à une espèce ou sous-espèce). En raison de leur présence en copies multiples dans le génome des trypanosomes, l'espacement interne transcrit 1 (ITS1) de l'ADN ribosomal et les ADN satellites sont les cibles privilégiées. L'ITS1 est une courte séquence d'ADN conservée au sein d'une même espèce, répétée 200 à 500 fois [11, 34]. L'amplification de l'ITS1 permet non seulement de détecter l'ensemble des trypanosomes (diagnostic pan-trypanosome), mais aussi de distinguer les espèces selon la taille des fragments amplifiés, en particulier *T. congolense*, *T. vivax*, et des trypanosomes appartenant au sous-genre Trypanozoon (*T. evansi* et *T. equiperdum*, *T. brucei* spp.). Les ADN satellites, quant à eux, sont des séquences répétées 10 000 à 20 000 fois dans le génome [11]. Leur amplification permet de détecter et d'identifier *T. vivax*, plusieurs sous-groupes de *T. congolense* (savane, forêt et kilifi), *T. godfreyi*, *T. simiae* et les Trypanozoon [11]. La distinction des espèces au sein du sous-genre Trypanozoon est plus délicate. En effet, il n'existe pas d'amorces spécifiques à proprement parler. Contrairement aux sous-espèces *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* qui chez l'homme peuvent être discriminées respectivement avec les amorces Tbs-GP [11] et Tbrc [40], il n'y a pas d'amorces spécifiques pour *T. b. brucei* chez l'animal. Ainsi, on considère un échantillon positif à *T. b. brucei* lorsque, à la fois, 1) la PCR avec les amorces TBR (permettant de détecter tous les Trypanozoon) est positive et 2) les PCR avec les amorces Tbs-GP et Tbrc sont négatives. Distinguer *T. evansi* de *T. equiperdum* par PCR est tout autant problématique. Le couple d'amorces actuellement utilisé cible le gène RoTat 1.2 (*Rode Trypanozoon antigenic type* 1.2, de *T. evansi* type A) qui est absent chez les espèces *T. brucei* s.l., *T. equiperdum*, et chez *T. evansi* de type B. Cependant, ce gène existe en copie unique, ce qui limite la sensibilité de la PCR. Il existe en outre certaines souches de *T. equiperdum* pour lesquelles les PCR RoTat 1.2 sont positives [7, 33]. De ce fait, l'ADN mitochondrial ou kinétoplastique (kDNA) est proposé par plusieurs auteurs comme cible pour distinguer *T. evansi* de *T. equiperdum* et de *T. brucei*. Le kinétoplaste contient des milliers de copies d'ADN circulaire dites mini- ou maxi-cercles en fonction de leur taille, contenant à leur tour des séquences nucléotidiques répétées et spécifiques de chaque espèce. *T. evansi* et *T. equiperdum* sont dépourvus de maxi-cercles et les souches bien connues de *T. evansi* disposent de mini-cercles



très différents (type A et type B). Et dernière difficulté, plusieurs souches de *T. evansi* sont dépourvues de kDNA [2]. Dernièrement, la technique LAMP (*Loop-mediated isothermal Amplification* pour amplification isothermique à médiation par boucle) a été développée pour détecter les trypanosomes. Elle est présentée comme étant rapide, spécifique, sensible et relativement simple. Elle nécessite peu de matériels de laboratoire et les résultats sont faciles à lire. Toutefois, technique sujette à contamination, des résultats faussement positifs sont fréquemment observés. Pour le moment, son usage n'a pas été approuvé pour le diagnostic de la TAA, bien qu'un kit ait été développé pour détecter les Trypanozoon dans le contexte de la THA [29].

Cibler l'ADN du parasite par PCR fait donc de cet outil un diagnostic plus sensible, plus spécifique et signant une infection active (durée de vie de l'ADN parasitaire estimée à 48 h) [21]. De plus, les tests moléculaires sont adaptés aux enquêtes à grande échelle [46]. Néanmoins, en cas de parasitémie très faible (<1 trypanosome/mL), les méthodes basées sur la PCR peuvent échouer [36].

1.4. Diagnostic immunologique : détection des anticorps sériques

Du fait de la persistance des anticorps dans la circulation pendant plusieurs mois suivant la guérison spontanée ou après traitement, leur détection ne signe pas une infection active, mais simplement le contact, présent ou passé, avec le parasite. Pour cette raison, le sérodiagnostic est surtout employé dans les études épidémiologiques.

Plusieurs tests ont été approuvés par l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) (Tableau II). Leur spécificité est limitée au

genre *Trypanosoma* [35, 36]. Le choix d'un test particulier est guidé par différents facteurs : son objectif (diagnostic individuel ou à l'échelle du troupeau), facteur économique, expertise [35].

Le test CATT/*T. evansi* (Card Agglutination Test for Trypanosomiasis), basé sur l'agglutination directe des parasites par des immunoglobulines spécifiques de type M (IgM), met en évidence une infection à *T. evansi*. Une préparation pure de *T. evansi*, exprimant un antigène variable prédominant (VSG RoTat 1.2) a été préalablement déposée sur une carte et colorée. L'agglutinat, résultant de la liaison des IgM présents dans le sérum ou le sang d'un animal infecté, aux antigènes parasitaires fixés sur la carte, est visible à l'œil nu [35, 36]. D'exécution rapide et facile sur le terrain, le test CATT/*T. evansi* est adapté à la confirmation de l'infection active d'un individu. Commercialisé sous forme de kit, il ne nécessite que peu d'expertise si on le compare aux autres tests sérologiques [46].

Le test de fixation du complément (CFT, Complement Fixation Test) (Fig. 1) détecte une infection à *T. equiperdum* [42].

Le test de trypanolyse est basé sur la lyse cellulaire par le système du complément (Fig. 2). Il permet de détecter les anticorps reconnaissant un seul épitope multicopie du variant VSG RoTat 1.2 de *T. evansi* de type A. La lyse des trypanosomes, en présence de complément, est observée au microscope [44].

Les tests CFT et de trypanolyse, indiqués pour le diagnostic individuel, nécessitent de bonnes installations de laboratoire et une expertise préalable.

Le test d'immunofluorescence indirecte (IFAT, Indirect Fluorescent Antibody Test) (Fig. 3) est privilégié dans les enquêtes à petite échelle [23]. Malgré la facilité d'obtention des antigènes, l'IFAT peut cependant prendre du temps et nécessite un microscope à fluorescence, matériel coûteux à l'achat. En plus, il ne permet pas le diagnostic de l'espèce en cause [46].

Le test ELISA [26, 35] (Fig. 4) est le « *gold standard* » du diagnostic sérologique de la TAA. Les anticorps sont détectés indirectement en utilisant le plus souvent des antigènes totaux solubles de *Trypanosoma* [26, 35], ou une protéine recombinante [3, 15, 16, 37].

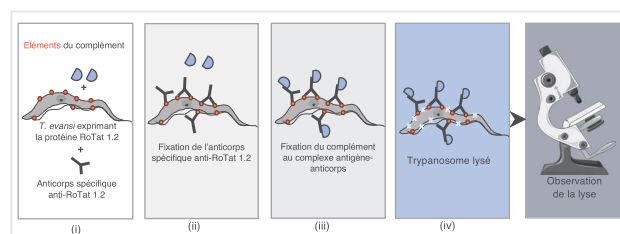


Figure 2. Principe du test de trypanolyse. Il est basé sur la capacité du complément à se fixer sur le complexe antigène-anticorps provoquant la lyse de trypanosomes. 1) Des trypanosomes vivants de la souche *Trypanosoma evansi* RoTat 1.2 (exprimant le variant RoTat 1.2 de glycoprotéines variables de surface) sont mis en contact avec du sérum, du plasma ou du sang d'un animal et du complément purifié de sérum de cobaye. 2) L'anticorps anti-RoTat 1.2 fixe la protéine RoTat 1.2 sur la surface du trypanosome. 3) Le complément se lie par la suite au complexe anticorps-antigène et 4) induit la lyse du parasite. Le test est positif lorsque le pourcentage de lyse est supérieur à 50 % [44].

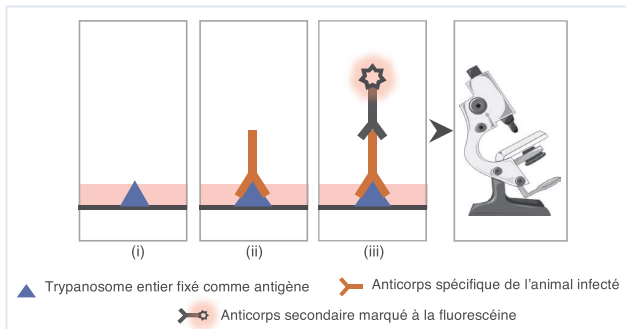


Figure 3. Principe du test de détection d'anticorps par immunofluorescence indirecte. La détection d'anticorps par immunofluorescence se fait selon le principe suivant : 1) Des trypanosomes en suspension ou dans un prélèvement sanguin sont fixés entre lame et lamelle. 2) Le sérum à tester est mis en contact avec les trypanosomes ; s'il contient des anticorps anti-trypanosomes, ils se lient aux trypanosomes. 3) Un anticorps conjugué à la fluorescéine fixe spécifiquement l'anticorps anti-trypanosomes et la fluorescence émise à une certaine longueur d'onde (après excitation du fluorochrome) est observée au microscope dit d'épifluorescence [9, 23, 46].

Le test ELISA de détection d'anticorps (ELISA-Ac) utilisant comme antigène la fraction soluble d'un extrait brut de parasites était l'un des seuls tests ELISA existants pour la TAA [4]. Les antigènes totaux, issus de trypanosomes du sang de rongeurs infectés, sont purifiés par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-

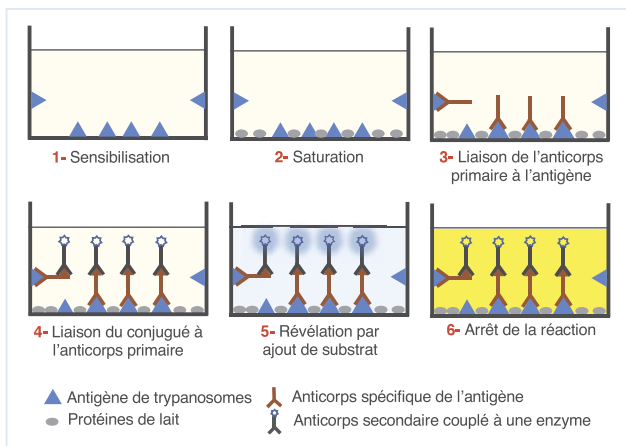


Figure 4. Principe du test de détection d'anticorps par immuno-absorption enzymatique (ELISA-Ac). La détection d'anticorps se fait en cinq étapes principales : 1) Sensibilisation de la plaque avec une préparation d'antigène (lysats totaux ou antigène recombinant). 2) Saturation de puits sur la plaque avec des protéines non spécifiques (lait ou albumine de sérum bovin). 3) Liaison des anticorps spécifiques (à l'antigène), provenant du sérum de l'animal. 4) Liaison de l'anti-sérum conjugué à une enzyme (peroxydase le plus souvent). 5) Révélation de la réaction antigène-anticorps par l'ajout d'un composé chromogène, substrat de l'enzyme : l'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) ou le 3,3',5,5'-Tétraméthylbenzidine (TMB) et mesure de la densité optique (DO). L'étape 6 est optionnelle, elle permet de mieux apprécier la coloration de la réaction.

cellulose [25] puis lysés. Cette production d'antigènes est assez difficile, et n'est pas standardisée [19]. De plus, le sacrifice d'un nombre important de rongeurs pour la préparation de larges quantités d'antigènes est éthiquement discutable.

Pour surmonter ces difficultés, plusieurs protéines recombinantes ont été produites et utilisées comme antigènes [13]. Des glycoprotéines invariables de surface de *T. congolense* et de *T. vivax* ont été testées ce qui a permis de développer un TDR pour *T. vivax* [15, 16]. Plus récemment, un test ELISA-Ac de *T. vivax* et *T. congolense* (VerYDiag® par CEVA) a été introduit sur le marché sous forme de TDR [4, 37]. Malgré son manque de sensibilité dans les infections très précoces ou au contraire à un stade très tardif, il renforce la spécificité et élimine le problème de standardisation. Pour l'espèce *T. evansi*, la glycoprotéine variante de surface RoTat 1.2 a été la plus étudiée [33]. Cependant, l'antigène non variable (rrISG75) s'est également révélé hautement spécifique et sensible pour la détection de *T. evansi* chez les chameaux [45]. Le problème commun à ces TDR est qu'ils restent peu accessibles notamment à cause d'une faible diffusion et de leur coût élevé.

L'inconvénient principal de ces techniques de détection d'anticorps est que les anticorps de type IgG, contrairement aux IgM, perdurent plusieurs mois après guérison. Ces tests ELISA ne sont donc pas indiqués pour le diagnostic d'une infection active. Ils ne sont pas spécifiques d'espèce. Par contre, de sensibilité élevée, l'ELISA est la méthode privilégiée dans les enquêtes à grande échelle [9].

1.5. Détection d'antigènes

La détection d'antigènes circulants de trypanosomes, preuve directe d'une infection active, devrait permettre une amélioration significative de la spécificité du diagnostic de TAA [31, 32]. Les premiers tests utilisaient des anticorps monoclonaux spécifiques de *T. congolense*, *T. vivax* et *T. brucei* pour la détection d'antigènes invariants et circulants, par ELISA de capture. Ils montrent une faible sensibilité pour la détection de *T. vivax*, et une faible spécificité (forte proportion de faux positifs), associée à une réactivité croisée pour *T. congolense* et *T. b. brucei* [1, 8, 46]. Ces échecs, liés notamment à la faible quantité d'antigènes libres circulants, ont conduit à les abandonner temporairement [8]. Par la suite, des épreuves sur bandelettes réactives [22] et un test LAT (*Latex Agglutination Test*) permettant de détecter spécifiquement *T. evansi* [30] ont été développés.

Récemment, un test de détection de la pyruvate kinase de *T. congolense* a été développé. Il s'agit d'un ELISA sandwich utilisant des *nanobodies* [38]. Ces anticorps propres aux Camelidae ont un domaine unique dix fois plus petit que celui d'une immunoglobuline classique. Chez les bovins expérimentalement infectés par *T. congolense*, ce nouveau test montre une sensibilité de 79 % et une spécificité de 91 %.

2. Quel avenir pour le diagnostic sérologique de la TAA ?

2.1. Nouveaux progrès dans l'immunodiagnostic

Bien que la TAA soit une maladie négligée par les industriels, des études innovantes sont menées pour l'amélioration de son diagnostic. Elles portent, notamment sur la standardisation de la production de l'antigène parasitaire, et sur la spécificité, en

particulier en ce qui concerne le diagnostic d'infections actives. Cette dynamique doit se poursuivre. Par exemple, au lieu d'utiliser une seule protéine recombinante comme unique antigène dans le test d'ELISA-Ac, la combinaison de plusieurs peptides immunogènes de différentes protéines doit être examinée. Une telle association pourrait permettre d'améliorer à la fois la sensibilité et la spécificité des tests. Ceci pourrait s'inscrire dans le cadre d'une collaboration d'industriels et d'instituts par le financement de projet de synthèse de protéines chimériques facilement standardisables.

2.2. Quelle solution pour le diagnostic de terrain ?

Il existe un cahier des charges à respecter pour qu'un test puisse être utilisé dans des conditions de terrain. Ces critères sont définis par le terme ASSURED : « *Affordable by those at risk of infection, Sensitive, Specific, User-friendly, Rapid, Equipment-free, Delivered to those who need it* » (en français, abordable pour les personnes à risque d'infection, sensible, spécifique, convivial, rapide, sans équipement, livré à ceux qui en ont besoin) [27]. Dans le diagnostic de la TAA, les méthodes moléculaires, y compris la PCR et nouvellement la LAMP, ne répondent pas aux critères « ASSURED ». Bien que très sensibles et très spécifiques, elles ne peuvent pas être utilisées sur le terrain, car elles nécessitent un laboratoire équipé, une expertise technique élevée et se prêtent difficilement au passage sous forme de TDR. À l'inverse, les tests de détection d'anticorps ou d'antigènes peuvent répondre aux critères « ASSURED » et, dans leur stade final de développement, être accessibles sous forme de TDR. Ainsi, en raison de la difficulté d'utilisation de la microscopie, le diagnostic de terrain de la TAA serait basé sur le test sérologique (sous forme de TDR) adapté pour les études de grande envergure (surveillance, étude de prévalence et contrôle de mesures de lutte). L'accessibilité de ces nouveaux outils tout comme la réduction de leur coût restent toutefois un challenge à relever.

Conclusion

Les trypanosomiasés animales, en particulier la nagana, sont des maladies qui, par leur impact socio-économique élevé en Afrique, peuvent être qualifiées de négligées. En l'absence de vaccin, outre la lutte antivectorielle, le contrôle de la maladie passe par le diagnostic et la chimiothérapie. Le diagnostic s'appuie sur la détection du parasite lui-même ou de ses constituants, ou sur la détection des anticorps produits par l'hôte. Le diagnostic parasitologique est souvent peu sensible et les méthodes moléculaires ne répondent pas aux conditions du terrain. Les tests immunodiagnostiques sous forme de TDR sont les mieux adaptés, et peuvent encore être améliorés. Peu de TDR sont cependant accessibles. Ainsi, dans l'attente de tests de capture d'antigènes, dont l'utilisation des *nanobodies* va permettre le développement, et qui constituent le Graal du diagnostic de terrain, deux recommandations majeures peuvent être formulées dans le but d'améliorer le diagnostic existant de la TAA : 1) développer un algorithme précis de diagnostic. Cet algorithme pourrait consister à l'emploi séquentiel de méthodes existantes : TDR en première ligne sur le terrain, suivi de la microscopie pour la confirmation des TDR positifs, puis du diagnostic moléculaire pour les identifications d'espèces ; 2) améliorer les tests existants pour faciliter la mise en place de cet algorithme. Ainsi la deuxième recommandation, qui constituera la première étape, va consister à travailler au développement de tests moléculaires plus sensibles, peut-être avec le test LAMP déjà utilisé pour le diagnostic de la THA, et des tests sérologiques plus spécifiques et standardisés, l'utilisation de chimères protéiques rassemblant les épitopes immunodominants de plusieurs antigènes constituant une option à privilégier.

Références

1. Bengaly Z, Kanwe A, Duvallat G. Evaluation of an antigen detection-ELISA test for the diagnosis of trypanosomiasis in naturally infected cattle. *Trop Med Parasitol*. 1995, **46**, 284-86.
2. Borst P, Fase-Fowler F, Gibson WC. Kinetoplast DNA of *Trypanosoma evansi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1987, **23**, 31-38.
3. Boulangé A, Katende J, Authie E. *Trypanosoma congolense*: Expression of a heat shock protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomosis. *Exp Parasitol*. 2002, **100**, 6-11.
4. Boulangé A, Pillay D, Chevtzoff C, et al. Development of a rapid antibody test for point-of-care diagnosis of animal African trypanosomosis. *Vet Parasitol*. 2017, **233**, 32-38.
5. Camara M, Camara O, Ilboudo H, et al. Sleeping sickness diagnosis: Use of buffy coats improves the sensitivity of the mini anion exchange centrifugation test. *Trop Med Int Health* 2010, **15**, 796-9.
6. Cauchard J, Soldan A, Madeline A, et al. Inter-laboratory ring trials to evaluate serological methods for dourine diagnosis. *Vet Parasitol*. 2014, **205**, 70-76.
7. Claes F, Radwanska M, Urakawa T, et al. Variable surface glycoprotein RoTat 1.2 PCR as a specific diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma evansi* infections. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2004, **3**, 3.
8. Desquesnes M. Comparison of the sensitivity of the Woo test and a test for detecting antigens to *Trypanosoma vivax* in 2 sheep experimentally infected with a Guyanese strain of the parasite. *Rev Elev Med Vet Pays Trop*. 1995, **48**, 247-53.
9. Desquesnes M. Standardisations internationale et régionale des épreuves immuno-enzymatiques : méthodes, intérêts et limites. *Rev Sci Tech*. 1997, **16**, 809-23.

10. Desquesnes M. Compendium of standard diagnostic protocols for animal trypanosomiasis of African origin. *CIRAD* 2017, pp. 1-106
11. Desquesnes M, Davila A. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: A review and perspectives. *Vet Parasitol.* 2002, **109**, 213-31.
12. Desquesnes M, Holzmuller P, Lai DH, *et al.* *Trypanosoma evansi* and surra: A review and perspectives on origin, history, distribution, taxonomy, morphology, hosts, and pathogenic effects. *Biomed Res Int.* 2013, **2013**, 194176.
13. Eysen LE, Vather P, Jackson L, *et al.* Recombinant and native TviCATL from *Trypanosoma vivax*: Enzymatic characterisation and evaluation as a diagnostic target for animal African trypanosomiasis. *Mol Biochem Parasitol.* 2018, **223**, 50-54.
14. FAO : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Programme de lutte contre la trypanosomose africaine (PLTA) | La maladie. 2021. www.fao.org/paat/the-programme/the-disease/fr.
15. Fleming JR, Sastry L, Crozier TW, *et al.* Proteomic selection of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma congolense*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014, **8**, e2936.
16. Fleming JR, Sastry L, Wall SJ, *et al.* Proteomic identification of immunodiagnostic antigens for *Trypanosoma vivax* infections in cattle and generation of a proof-of-concept lateral flow test diagnostic device. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016, **10**, e0004977.
17. Giordani F, Morrison LJ, Rowan TG, *et al.* The animal trypanosomiasis and their chemotherapy: A review. *Parasitol.* 2016, **143**, 1862-89.
18. Horn D. Antigenic variation in African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 2014, **195**, 123-9.
19. Ijagbone I, Staak C, Reinhard R. Fractionation of trypanosome antigens for species-specific sero-diagnosis. *Vet Parasitol.* 1989, **32**, 293-99.
20. Ilemobade A. Tsetse and trypanosomiasis in Africa: The challenges, the opportunities. *Onderstepoort J Vet Res.* 2009, **76**, 35-40.
21. Jarra W, Snounou G. Only viable parasites are detected by PCR following clearance of rodent malarial infections by drug treatment or immune responses. *Infect Immun.* 1998, **66**, 3783-87.
22. Kashiwazaki Y, Snowden K, Smith DH, *et al.* A multiple antigen detection dipstick colloidal dye immunoassay for the field diagnosis of trypanosome infections in cattle. *Vet Parasitol.* 1994, **55**, 57-69.
23. Katende J, Nantulya V, Musoke A. Comparison between bloodstream and procyclic form trypanosomes for serological diagnosis of African human trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987, **81**, 607-08.
24. Kristjanson PM, Swallow BM, Rowlands G, *et al.* Measuring the costs of African animal trypanosomiasis, the potential benefits of control and returns to research. *Agric Syst.* 1999, **59**, 79-98.
25. Lanham SM, Godfrey D. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol.* 1970, **28**, 521-34.
26. Luckins A. Detection of antibodies in trypanosome-infected cattle by means of a microplate enzyme-linked immunosorbent assay. *Trop Anim Health Prod.* 1977, **9**, 53-62.
27. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, *et al.* Diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol.* 2004, **2**, 231-40.
28. Matovu E, Mugasa CM, Ekangu RA, *et al.* Phase II evaluation of sensitivity and specificity of PCR and NASBA followed by oligochromatography for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples from D.R. Congo and Uganda. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010, **4**.
29. Mitashi P, Hasker E, Ngoyi DM, *et al.* Diagnostic accuracy of Loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013, **7**, e2504-e04.
30. Nantulya V. Suratex: a simple latex agglutination antigen test for diagnosis of *Trypanosoma evansi* infections (surra). *Trop Med Parasitol.* 1994, **45**, 9-12.
31. Nantulya V, Lindqvist K. Antigen-detection enzyme immunoassays for the diagnosis of *Trypanosoma vivax*, *T. Congolense* and *T. Brucei* infections in cattle. *Trop Med Parasitol.* 1989, **40**, 267-72.
32. Nantulya V, Musoke A, Rurangirwa F, *et al.* Monoclonal antibodies that distinguish *Trypanosoma congolense*, *T. vivax* and *T. brucei*. *Parasite Immunol.* 1987, **9**, 421-31.
33. Ngaira JM, Olembo NK, Njagi EN, *et al.* The detection of non-RoTat 1.2 *Trypanosoma evansi*. *Exp Parasitol.* 2005, **110**, 30-8.
34. Njiru ZK, Constantine CC, Guya S, *et al.* The use of ITS1 rDNA PCR in detecting pathogenic African trypanosomes. *Parasitol Res.* 2005, **95**, 186-92.
35. OIE. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018, Ch. 3.4.16, pp. 1222-35.
36. OIE. In Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 2018, Ch. 3.1.21, pp. 660-74.
37. Pillay D, Izotte J, Fikru R, *et al.* *Trypanosoma vivax* GM6 antigen: A candidate antigen for diagnosis of African animal trypanosomiasis in cattle. *PLoS One* 2013, **8**, e78565.
38. Pinto Torres JE, Goossens J, Ding J, *et al.* Development of a nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. *Sci Rep.* 2018, **8**, 9019.
39. Potts A, Human M, Theron R, *et al.* SAVLSF Harmonized serology SOP for Dourine complement fixation test. *South African Veterinary Laboratory Scientific Forum.* 2013, **2**, pp. 1-27.
40. Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, *et al.* The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 2002, **67**, 684-90.
41. Radwanska M, Guirnalda P, De Trez C, *et al.* Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. *PLoS Pathog.* 2008, **4**, e1000078.
42. Schoening H. Trypanosomiasis in camels: Its detection by complement fixation. *J Infect Dis.* 1924, 608-13.
43. Taylor K, Authié EM-L. Pathogenesis of animal trypanosomiasis. In Maudlin I, Holmes PH et Miles MA (eds), « The Trypanosomiasis ». *CABI Publishing, Wallingford*, 2004, pp. 331-353.
44. Tehseen S, Jahan N, Qamar MF, *et al.* Parasitological, serological and molecular survey of *Trypanosoma evansi* infection in dromedary camels from Cholistan Desert, Pakistan. *Parasit Vectors.* 2015, **8**, 415.
45. Tran T, Claes F, Verloo D, *et al.* Towards a new reference test for surra in camels. *Clin Vaccine Immunol.* 2009, **16**, 999-1002.
46. Uilenberg G, Boyt W. A field guide for the diagnosis, treatment and prevention of African animal trypanosomiasis. *Food & Agriculture Org.*, 1998.
47. Woo P. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Acta tropica* 1970, **27**, 384-6.