

P6/15. Dialogue moléculaire entre parasites et hôtes: le modèle du trypanosome. **Rapport de synthèse (mai 2012)**

1. Résultats de la recherche

1.1. Résultats de l'ULB.

Dans la continuité des recherches antérieures, le groupe de l'**ULB** a principalement concentré ses activités sur deux thématiques particulières, la caractérisation des composants des machineries transcriptionnelles de *Trypanosoma brucei*, et l'élucidation des composants et mécanismes en jeu dans le processus de résistance ou de sensibilité des trypanosomes Africains au facteur trypanolytique du sérum humain. L'enjeu de la première thématique concerne la compréhension des contrôles assurant l'expression mono-allélique, par la RNA polymérase I (ribosomique), de l'antigène variable de surface du trypanosome, c'est-à-dire la caractérisation des processus moléculaires sous-jacents à la variation antigénique du parasite. La deuxième thématique concerne l'adaptation de l'homme au trypanosome par l'acquisition d'une défense immune innée (facteur sérique trypanolytique), et les processus par lesquels deux parasites, *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*, sont arrivés à contourner ces défenses et parviennent à infecter l'homme en développant la maladie du sommeil.

1.1.1. Contrôles transcriptionnels et caractérisation des machineries concernées. La synthèse des deux antigènes majeurs spécifiques de stade de développement du parasite, le VSG (forme sanguicole) et la procycline (forme procyclique, spécifique de l'insecte vecteur) est contrôlée au niveau transcriptionnel. L'activité des unités transcriptionnelles de ces gènes est gérée de façon mutuellement exclusive, par une RNA polymérase de type ribosomique (Pol I).

Deux candidats au titre de facteurs régulateurs de la transcription dans ces unités, les homologues du complexe multi protéique TFIID et de la protéine TFIIS, ont été étudiés en détails. Dans le cas de TFIID, chez le trypanosome nous n'avons pas pu mettre en évidence le sous-complexe CAK, suggérant qu'une forme réduite de TFIID existe chez cet organisme eucaryotique primitif. Comme attendu, la fonction de TbTFIID est apparue pléiotrope, aussi bien au niveau de la transcription que du contrôle du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. Son implication dans les contrôles transcriptionnels des unités VSG et procycline a été établie (perte partielle de la sélectivité de stade), mais ceci pourrait être indirectement lié à un effet sur la Pol II. Concernant TFIIS nous avons révélé l'existence de deux isoformes, et suggéré que ces deux protéines se complètent pour assurer une fonction vitale. L'intervention des TbTFIIS dans les contrôles transcriptionnels n'a pu être établie.

Concernant le mécanisme de contrôle mono-allélique des différentes unités de transcription VSG, nous avons pu montrer par PCR restreinte à une seule cellule qu'au tout début de ces unités des transcrits sont synthétisés à partir de plusieurs, voire de tous les promoteurs de transcription de ces unités, confirmant notre proposition que le contrôle de ces unités s'opère au niveau de l'élongation, et non de l'initiation, de la transcription.

1.1.2. Caractérisation du facteur trypanolytique du sérum humain. Deux protéines sériques spécifiquement humaines ont été successivement présentées comme étant trypanolytiques : l'haptoglobine-related protein (Hpr) et l'apolipoprotéine L1 (apoL1). Le sérum humain normal contient deux types de particules porteuses de ces deux protéines. Ces particules sont respectivement une sous-fraction d'HDLs (TLF-1) et un agrégat d'IgMs (TLF-2). Par l'étude du

potentiel trypanolytique de sérums humains naturellement dépourvus d'apoL1 ou d'Hpr, nous avons établi que l'apoL1 est la seule toxine sérique capable de tuer le trypanosome, et que l'Hpr ne jouait qu'un rôle de ligand permettant l'internalisation de TLF-1, mais non de TLF-2. Nous avons identifié et caractérisé le récepteur du parasite qui fixe l'Hpr et permet l'internalisation des particules TLF-1 : il s'agit d'un récepteur de surface initialement destiné à la capture spécifique du complexe haptoglobine (Hp)-hémoglobine (Hb). Ce récepteur ne discriminant pas entre les complexes Hp-Hb et Hpr-Hb, fixe avidement les particules de TLF-1 porteuses du complexe Hpr-Hb. Nous avons montré que la raison d'être de ce récepteur est de permettre l'import d'hème à partir de la dégradation d'Hb. En effet, contrairement à l'idée généralement répandue jusque là, nous avons montré que les formes sanguicoles du trypanosome ont besoin d'hème pour alimenter des hémoprotéines, dont l'activité permet au parasite de résister au stress oxydatif des macrophages. Une de ces protéines a été identifiée : il s'agit du cytochrome P450 CYP51, dont l'activité lanostérol déméthylase est nécessaire à la composition lipidique de la membrane plasmique. Concernant TLF-2, nous avons montré que dans les conditions physiologiques normales, c'est-à-dire en présence d'Hp, ces particules représentent le facteur trypanolytique principal.

1.1.3. Résistance à l'apoL1 chez *T. b. rhodesiense* et *T. b. gambiense*. Concernant le mécanisme de résistance à l'apoL1 médié par la protéine SRA de *T. b. rhodesiense*, nous avons confirmé qu'il nécessitait une interaction avec l'hélice C-terminale de l'apoL1, qui est dépendante d'un pH acide et est suffisante pour neutraliser la toxicité de l'apoL1 dans *Escherichia coli*. Nous avons défini des mutations de cette hélice qui empêchent l'interaction avec SRA et rendent donc ces versions mutantes de l'apoL1 capables de tuer *T. b. rhodesiense*. De façon inattendue et très intéressante, nous avons ensuite découvert, en collaboration avec des laboratoires américains, que des mutations très similaires de l'hélice C-terminale de l'apoL1 avaient été sélectionnées chez des individus d'origine Africaine récente. Ces mutations, très fréquentes en Afrique, permettent à l'homme de résister à *T. b. rhodesiense* mais sont par ailleurs associées au développement d'une sclérose des reins appelée insuffisance rénale terminale. Nous pensons que cette maladie résulte d'un déficit d'autophagie lié aux mutations de l'apoL1 (voir 1.1.4).

Concernant le mécanisme de résistance à l'apoL1 chez *T. b. gambiense*, nous avons identifié la protéine impliquée. Cette protéine n'affecte pas le trajet intracellulaire de l'apoL1, et n'interagit pas avec l'hélice C-terminale de cette protéine. La région peptidique conférant la résistance à l'apoL1 a été cernée par mutagenèse, et le mécanisme d'action est toujours à l'étude. Par ailleurs nous avons montré qu'une simple mutation inactive le récepteur Hp-Hb chez *T. b. gambiense*. Nous avons pu démontrer que cette mutation est nécessaire pour compléter le mécanisme de résistance de la protéine antidote dans certaines conditions. Enfin, une élévation de l'activité de protéases endosomales, qui caractérise aussi *T. b. gambiense*, contribue à renforcer la résistance à l'apoL1.

Nous pensons que la haute fréquence de mutations de l'apoL1 permettant la résistance à *T. b. rhodesiense* en Afrique de l'Ouest a conduit à l'élimination de ce parasite dans cette région, autorisant la propagation d'un autre variant de *T. b. brucei (gambiense)* qui résiste à l'apoL1 par un mécanisme distinct de celui employé par *T. b. rhodesiense*.

1.1.4. Etude des apoLs intracellulaires.

Les apoLs partagent des similitudes structurales et fonctionnelles avec les protéines apoptotiques de la famille Bcl-2. Entre autres caractéristiques, les apoLs possèdent dans leur

domaine formateur de pores ioniques une signature BH3 (Bcl-2 Homology 3), connue pour promouvoir les interactions entre membres de la famille Bcl-2 et autres protéines BH3-only, interactions cruciales pour le contrôle de la mort cellulaire. Nous avons entrepris l'étude de ces protéines tant chez l'homme que chez la souris. En particulier, nous avons entamé la génération de souris KO pour la totalité des membres de la famille apoL (13 isoformes). Nous avons focalisé les recherches sur les sous-familles murines apoL7 et apoL11, qui sont principalement exprimées dans les organes lymphoïdes et les cellules du système immunitaire. Etant donné leur rôle central dans l'immunité, nous avons concentré notre analyse sur les cellules dendritiques (DCs). L'expression de certains isoformes d'apoL est induite lors de la maturation des DCs. Cette expression est restreinte à la sous-fraction CD8a+, qui est caractérisée par sa durée de vie plus courte et sa capacité à cross-présenter des antigènes exogènes. En couplant un peptide self-pénétrant avec les peptides concernés, nous avons pu montrer que le domaine BH3 des apoLs 7 et 11 est fonctionnel et déclenche un type de mort cellulaire mélangeant des caractéristiques d'apoptose et d'autophagie. Par microscopie confocale et expériences de RT-PCR quantitative, nous avons montré que l'expression des apoLs est activée par des stimuli d'autophagie. De plus, nous avons pu localiser ces apoLs dans des autophagosomes, et nous avons obtenu l'évidence, par immunoprécipitation, d'une interaction entre apoLs et la protéine autophagique BH3-only Beclin-1. Afin de caractériser la voie d'activation des apoLs, nous avons testé une série d'agonistes spécifiques des différents récepteurs Toll-like (TLRs) sur des lignées de DCs CD8a+ (obtenues de H. Acha Orbea). Nous avons observé que l'agoniste du TLR3 poly(I :C), une molécule mimétique des ARNs double-brins viraux, est l'activateur le plus puissant des apoLs. Par l'étude de différentes lignées de DCs KO pour différents composants de la voie de signalisation TLR3, nous avons montré que l'activation des apoLs est dépendante de TLR3 et TRIF (détection de dsRNAs endosomiques), mais non de CARDIF (détection de dsRNAs cytosoliques). En accord avec ces données, l'autophagie a été associée à la signalisation TLR3 dans de nombreuses études. De plus, nous avons observé par microscopie confocale que des vésicules positives pour TLR3 sont également positives pour l'apoL7. L'influence de l'expression des apoLs sur la mort cellulaire induite par le poly(I :C) a été évaluée par l'utilisation de différents morpholinos anti-apoL. Certains morpholinos ont en effet réduit significativement cet effet. Des résultats préliminaires suggèrent que le morpholino ciblant l'apoL7a augmente l'autophagie et réduit le clivage de la caspase 9, tandis que les morpholinos ciblant les apoL7be et apoL11 ont des effets opposés. Ces observations suggèrent un rôle des apoLs dans la balance entre apoptose et autophagie, avec des effets différents en fonction des isoformes d'apoL considérés.

Nous proposons que les apoLs soient induites dans les DCs CD8a+ suite à la détection, par la voie TLR3/TRIF, d'une infection virale. Cette induction pourrait favoriser l'autophagie au détriment de l'apoptose. Ce délai pourrait favoriser la présentation antigénique, orientant la cross-présentation des antigènes viraux via l'autophagie, et permettant aux DCs d'activer efficacement les lymphocytes T avant de mourir, ou de supporter l'apoptose quand les DCs sont activées depuis longtemps.

1.1.5. Caractérisation de la machinerie d'endocytose. Nous avons montré que le récepteur Hp-Hb du parasite n'est plus exprimé dans la forme stumpy. Ceci fournit un nouvel outil diagnostique très précis de la transition slender-stumpy. Par ailleurs, l'étude de l'endocytose

dans cette forme a révélé des transformations morphologiques non encore décrites, comme la migration du lysosome au cours du processus de différenciation cellulaire.

1.1.6. Etude de la signalisation cellulaire (collaboration **ULB-VUB-LMUM-ITG**). Les trypanosomes Africains sont caractérisés par l'expansion considérable du nombre de gènes d'adénylate cyclase. Ceci est d'autant plus intrigant que l'activité d'adénylate cyclase est extrêmement faible en conditions normales, et que le rôle du cAMP est toujours inconnu chez ces organismes. Par ailleurs il est remarquable de constater que différentes conditions de stress environnemental, y compris des conditions lytiques pour le parasite, stimulent l'ensemble de ces enzymes. Par l'analyse de trypanosomes transgéniques soit dépourvus du gène prototypique de cette famille (ESAG4), soit équipés d'un système « dominant-négatif » permettant l'inactivation globale des fonctions concernées, nous avons étudié le rôle des multiples isoformes d'adénylate cyclase. Ces travaux ont révélé que la sous-famille ESAG4 intervenait dans le processus de division cellulaire, mais qu'au moins 50% de l'activité d'adénylate cyclase globale n'était pas requise en conditions normales, mais permettait au parasite de résister à la défense immunitaire innée de l'hôte, en inhibant la synthèse de la cytokine anti-parasitaire TNF- α par les macrophages. Nous avons montré que l'activation par défaut de l'adénylate cyclase de trypanosomes en cours de phagocytose par les macrophages permet une stimulation de la PKA des macrophages et l'inhibition de la production de TNF- α . Donc, nous avons mis en évidence que tôt dans l'infection, les trypanosomes phagocytés par les macrophages participent à la colonisation de l'hôte en s'opposant au développement d'un contexte anti-parasitaire.

1.2. Résultats de la VUB.

Les trypanosomiasés africaines sont des maladies parasitaires négligées qui affectent une grande variété de mammifères dont les humains en Afrique subsaharienne. Actuellement, les traitements disponibles sont peu nombreux et limités par les problèmes de toxicité. En outre, des caractéristiques du parasite empêchent le développement d'un vaccin, ce qui compromet la lutte contre ces maladies. Une comparaison de la réponse immunitaire chez des hôtes qui sont naturellement trypanosusceptibles et trypanotolérants (c-à-d en mesure ou non de contrôler la pathogénicité/destruction tissulaire induite par les trypanosomiasés) représente une approche prometteuse pour découvrir les processus qui contribuent à lutter contre ces maladies.

Au début de la phase VI des PAI, nous et d'autres avons montré que la survie à long terme et la trypanotolérance nécessitent le développement de cellules myéloïdes dans un état classique d'activation (M1). Ces cellules M1, induites par des voies dépendantes de l'IFN- γ et de MyD88, sécrètent des molécules trypanotoxiques, telles le TNF et le NO, et phagocytent les parasites opsonisés. Toutefois, une activation excessive des cellules M1 et des cellules T produisant l'IFN- γ induit une pathogénicité sévère, notamment une anémie et des lésions hépatiques qui entraînent la mort de l'hôte. Cette activité pathogénique des cellules M1 est inhibée par l'IL-10 produite par des cellules myéloïdes activées de manière alternative (M2) et des cellules T régulatrices (Tregs). Une conversion des cellules M1 en M2 réduisant la pathogénicité peut être efficacement induite en traitant des souris infectées avec l'ancre glycoposphatidylinositol (GPI) de VSG ou en induisant une expansion des cellules Tregs grâce à l'anticorps « superagonist » anti-CD28. Nos principaux objectifs dans la phase VI des PAI ont été dès lors de continuer à disséquer la contribution des cellules M1 et M2, et des gènes exprimés par ces cellules, à la

trypano-susceptibilité/tolérance. Nous avons aussi initié une analyse plus détaillée de l'hétérogénéité des cellules myéloïdes induites chez les souris infectées ainsi que des fonctions de ces sous-populations. En parallèle, en collaboration avec l'**ULB, ITG** et **LMUM**, des efforts ont été consacrés à étudier plus avant la régulation de l'activation des cellules myéloïdes par des protéines trypanosomiales et la salive du vecteur (mouche tsetse). Enfin, les mécanismes empêchant une réponse humorale et une vaccination efficaces chez l'hôte infecté par des trypanosomes ont été analysés. Les modèles murins de la trypanosomiase que nous avons développés sont considérés comme des outils précieux pour révéler la contribution des cellules myéloïdes à différents aspects de l'interaction trypanosomes - système immunitaire de leur hôte naturel. Aussi, les informations recueillies lors de nos investigations pourraient identifier des stratégies originales pour augmenter la trypanotolérance et améliorer la vaccination. En outre, ces informations pourraient trouver des applications dans le traitement de maladies dans lesquelles les cellules myéloïdes contribuent à la pathogénicité (tel le syndrome inflammatoire systémique aigu ou l'anémie associée à la maladie chronique).

Voici un résumé des principaux résultats obtenus.

1. 2.1. Mécanismes induisant la production d'IFN- γ nécessaire au développement des cellules M1. L'IL-12p70, mais pas l'homodimère IL12p40 ou l'IL-23, a été identifié comme requis pour l'induction d'IFN- γ nécessaire au développement de cellules M1 contrôlant efficacement la croissance des trypanosomes. En outre, nous avons montré que le TNF produit par ces cellules M1 induit la production de NO trypanotoxique par ces dernières cellules en interagissant avec son récepteur TNFp55 (mais pas TNFp75). Cependant, les mécanismes de contrôle de la parasitémie lors d'une infection par *T. evansi* semblent différer des autres trypanosomes africains, étant indépendants de la cascade IFN- γ /TNF/NO et uniquement dépendants des IgM.

1.2.2. Rôle des gènes exprimés par des cellules M1 et M2 dans la pathogénicité induite par les trypanosomes africains. L'activation incontrôlée des cellules M1 contribue au développement des lésions hépatiques, ainsi qu'à l'anémie en augmentant l'érythrophagocytose, en réduisant les taux de fer dans le sang et d'érythropoïèse dans la moelle osseuse, et en induisant une érythropoïèse extramédullaire. Des analyses génétiques et phénotypiques des tissus hépatiques d'animaux infectés ont montré une induction des récepteurs de surface cellulaires impliqués dans l'absorption des globules rouges (FcR, CD36) et des composés contenant du fer (CD163, CD91, Tf-R1, Tf-R2). Des gènes pouvant influencer négativement l'homéostasie du fer sont également significativement induits (HO-1, DMT-1, FHC, FPN-1, CP, Tf). En outre, nous avons montré que l'emprisonnement des réticulocytes et des globules rouges matures dans la rate contribue à l'anémie associée à l'infection par des voies de signalisation dépendantes du TNF/TNF-R1/MyD88.

Grâce à une analyse comparative des gènes exprimés par des cellules myéloïdes isolées chez des souris trypanosusceptibles ou trypanotolérantes (ex: des souris Il10 KO infectées par *T. congolense* ou des souris infectées par *T. brucei* et traitées avec le GPI ou avec l'anticorps anti-CD28 qui induit l'expansion des cellules Tregs), nous avons identifié un certain nombre de gènes et miARNs exprimés sélectivement par des cellules M1 ou M2, qui représentent des cibles potentielles pour le traitement de la trypanosomiase. Mif et Lgal3 (codant pour le « Macrophage migration Inhibitory Factor » et « Galectin-3 ») représentent des exemples de gènes exprimés par les cellules M1 qui contribuent à la trypanosusceptibilité. Grâce à des souris Mif KO, Cd74 KO ou des souris traitées avec un anticorps neutralisant MIF (collaboration avec R.

Bucala, Yale University, New Haven, USA), nous avons montré que MIF, via son récepteur CD74, contribue à l'infiltration des monocytes inflammatoires CD11b+Ly6c+ dans le foie et la rate ainsi qu'à leur différenciation en cellules M1 pathogéniques (voir ci-dessous). De même, nous avons montré qu'en l'absence de galectin-3, la production de molécules pathogéniques (IFN- γ , TNF, NO) diminue et la production d'IL-10 anti-pathogénique augmente. Parmi les gènes induits par l'IL-10 dans des cellules M2 ayant un rôle potentiel dans la trypanotolérance que nous avons identifiés, Nfkb1 et Sepp1 codant pour la sous-unité NF-kB p50 et la sélénoprotéine P, ont été sélectionnés pour une analyse fonctionnelle. Nous avons montré que la sélénoprotéine P limite la pathogénicité de la maladie grâce à son activité anti-oxydante qui protège les myéloïdes du foie de l'apoptose, préservant ainsi leur capacité à tuer les parasites. D'autre part, nous avons documenté que l'accumulation préférentielle dans le noyau cellulaire de la sous-unité NF-kB p50 (par rapport à NF-kB p65) représente un mécanisme anti-pathogénique induit par l'IL-10 qui régule la production de TNF par les cellules M1 et favorise ainsi la trypanotolérance.

1.2.3. Hétérogénéité fonctionnelle des cellules myéloïdes chez les souris infectées par les trypanosomes africains. Nos données récentes montrent que les cellules myéloïdes du foie de souris infectées contiennent différentes populations, telles des cellules « résidentes » de type cellules dendritiques et macrophages (cellules de Kupffer), et des cellules « recrutées » ayant pour origine des monocytes circulants dit inflammatoires (CD11b+Ly6C+CCR2+) ou « patrolling » (CD11b+Ly6C-CX3CR1+). Nous avons également potentiellement identifiés des « macrophages centraux », essentiels dans l'homéostasie du fer et de l'érythropoïèse mais mal caractérisés. La contribution relative des sous-populations cellulaires résidentes et recrutées à l'issue d'une infection trypanosomiale est actuellement étudiée. Ainsi, nous avons identifié les cellules M1 pathogéniques comme des cellules CD11b+CD11c+Ly6C+ produisant du TNF et du NO (« Tip-DCs »). La différenciation de ces cellules dans le foie de souris infectées requiert trois étapes : (i) une étape CCR2-dépendante cruciale pour l'extravasation des monocytes inflammatoires CD11b+Ly6C+CD11c⁻ (MIs) de la moelle osseuse; (ii) une étape de différenciation dans le foie de ces MIs en cellules dendritiques inflammatoires immatures (CD11c+ mais CD80/CD86/MHC-II⁻) qui dépend de l'IFN- γ et MyD88; et (iii) une étape de maturation des cellules dendritiques inflammatoires en Tip-DCs fonctionnelles (CD80/CD86/MHC-II⁺) qui dépend de l'IFN- γ et MyD88. En outre, l'IL-10 agit à plusieurs niveaux pour diminuer la pathogénicité des Tip-DCs pendant l'infection. Ainsi, l'IL-10 limite l'extravasation des MIs de la moelle osseuse en limitant la production de CCL2 par les cellules myéloïdes hépatiques, ainsi que leur différenciation et maturation en Tip-DCs dans le foie.

Outre la caractérisation de la sous-population des cellules M1 pathogéniques chez les souris infectées par les trypanosomes, nous avons identifié les macrophages centraux comme étant des cellules CD11b-F4/80+ER-HR3+. Parmi ces dernières, des cellules Ly6C⁻ et Ly6C⁺ représentent vraisemblablement des sous-populations résidentes et recrutées. Fait intéressant, en comparant des animaux trypanosusceptibles et trypanotolérants, nous avons observé une corrélation inverse entre la présence de ces cellules et l'induction de l'anémie.

1.2.4. Les cellules M2 produisant l'IL-10 ne sont pas suffisantes pour la trypanotolérance. Nous avons précédemment identifié chez des souris infectées par *T. congolense* les cellules CD4+Foxp3+ Tregs comme une source d'IL-10 qui limite le développement des cellules M1 et T pathogéniques, empêchant ainsi la destruction du foie. Bien que les cellules myéloïdes représentent une autre source d'IL-10 chez ces souris, leur rôle dans la trypanotolérance n'était

pas connu. En utilisant des souris IL-10^{flox/flox}LysM-Cre^{+/+}, nous avons documenté que l'IL-10 produit spécifiquement par des cellules myéloïdes limite l'activation des cellules M1 au niveau de leur production de TNF sans affecter (i) l'expression d'autres gènes associés à des cellules M1 (Il12p40, Nos2, Ccl2, Cxcl9, Cxcl10, Cxcl11, (ii) l'expression de gènes exprimés par des cellules M2 dont l'expression dépend de IL-10 (Sepp1, F13a, Ctss, Ngfb, Mrc1), (iii) le recrutement de cellules CD11b+Ly6C⁺ (MIs) dans le foie et (iv) la production d'IFN- γ par les cellules T pathogéniques. Il en résulte, chez les souris dépourvues d'IL-10 provenant des cellules myéloïdes, des dommages hépatiques légers qui n'affectent pas la survie. Comparativement, l'absence totale d'IL-10 ou l'absence d'IL-10 produite par les cellules Tregs chez des souris infectées entraîne la production accrue des molécules pathogéniques produites par les cellules M1 et T mentionnées ci-dessus qui endommage le foie de façon irréversible, écourtant la survie. Par conséquent, la fonction des cellules Tregs (et d'autres cellules productrices d'IL-10 comme les Tr1 et Breg) est nécessaire pour (i) désactiver efficacement les cellules M1 et T pathogéniques, (ii) induire l'expression de gènes dépendants de IL-10 chez des cellules M2, et (iii) limiter les atteintes hépatiques et ainsi prolonger la survie des souris infectées.

1.2.5. Mécanisme de destruction des cellules B chez les souris infectées par les trypanosomes africains. Bien que les anticorps contribuent à l'élimination des trypanosomes de la circulation sanguine, *T. brucei* induit une activation polyclonale et un épuisement des lymphocytes B, la disparition des cellules B présentes dans la zone marginale (MZB) et folliculaire (FOB) de la rate, ainsi que la destruction des cellules B à mémoire. Il en résulte une incapacité de l'hôte à contrôler la parasitémie. Nous avons montré que l'infection affecte également la lymphopoïèse des cellules B à différents niveaux. Ainsi, en induisant une apoptose massive des cellules B de transition dans la rate, le parasite empêche la reconstitution du pool des cellules B2 matures, ce qui favorise sa survie chez l'hôte. En outre, nous avons montré une réduction >95% dans la moelle osseuse du nombre des précurseurs des cellules B (CLP, pré-pro-B, pro-B, pré-B, cellules B immatures). L'infection induit également une lymphopoïèse des cellules B extramédullaire, mise en évidence par une augmentation significative dans la rate des populations HSC-PPSP, CLP, pré-pro-B, pro-B et des pré-B. La maturation finale des cellules B est également abrogée suite à une induction de l'apoptose chez les populations T1 et T2 de cellules B de transition. Cette apoptose ne dépend pas du TNF, de Fas et des prostaglandines, mais d'un contact direct entre le parasite et les cellules B T1 et T2.

1.2.6. Modulation de l'activité des cellules myéloïdes par des composants de trypanosomes et par la salive de la mouche tsetse. Outre le GPI, nous avons caractérisé d'autres molécules trypanosomiales affectant la fonction des cellules myéloïdes. (i) Un isoforme de la chaîne lourde de la kinésine favorisant la survie du parasite chez la souris a été identifié (en collaboration avec l'**ULB, ITG**, Dr. Vincendeau, Bordeaux). En interagissant avec les cellules myéloïdes, TbKHC1 déclenche la production d'IL-10 par une voie dépendante de SIGN-R1. Il en résulte une augmentation de l'activité arginase et une réduction de l'activité NO synthase. Au cours de la première vague de parasitémie, cette activité arginase induit une augmentation de la production de polyamines qui favorise la croissance du parasite. (ii) L'adénylate cyclase ESAG4 de *T. brucei* quant à elle, favorise la colonisation de l'hôte par le parasite en inhibant la synthèse initiale de la cytokine trypanotoxique TNF par les monocytes inflammatoires CD11b+Ly6C⁺ (MIs) (collaboration **ULB-VUB-LMUM-ITG**).

D'autre part, en collaboration avec l'ITG, l'effet de la salive sur l'activation des cellules myéloïdes de souris exposées aux trypanosomes a été analysé par profil d'expression génique. Les expériences indiquent clairement que des cellules dendritiques immatures exposées aux trypanosomes développent une réponse inflammatoire, mais que cette dernière est inhibée par la salive. Cette réduction d'expression des gènes identifiés pourrait être directement liée à la capacité de la salive à favoriser la colonisation de l'hôte par le parasite.

1.2.7. Anticorps bloquant l'endocytose en tant qu'agents thérapeutiques. Les trypanosomes africains ont développé des mécanismes tels la variation antigénique de VSG pour échapper à la réponse immunitaire humorale de l'hôte. Grâce à une endocytose et un recyclage très rapides de leur surface membranaire, les parasites retardent leur destruction par des anticorps anti-VSG conventionnels. Nous avons maintenant montré, en collaboration avec l'ULB, que des fragments d'immunoglobines monovalents, notamment des Nanobodies® de 15 kDa provenant des chaînes lourdes des anticorps de camélidés (HCAbs), peuvent reconnaître des épitopes spécifiques de VSG et ainsi lyser efficacement les trypanosomes *in vitro* et *in vivo*. Cette lyse est précédée d'une immobilisation très rapide des parasites, d'un élargissement massif de la poche flagellaire et d'un blocage de l'endocytose. Il en résulte des perturbations métaboliques (réduction des niveaux d'ATP intracellulaire, perte de potentiel de la membrane mitochondriale) aboutissant à la mort cellulaire. Ces Nanobodies® de faible poids moléculaire spécifiques de VSG offrent une nouvelle opportunité thérapeutique contre les trypanosomiases. De façon intéressante, une protéolyse par la papaine des anticorps anti-VSG conventionnels a permis de révéler leur activité trypanolytique potentielle.

1.3. Resultaten van de UCL

Het onderzoek van de UCL groep heeft zich geconcentreerd op de energie en koolhydraat stofwisseling van de parasieten van de Trypanosomatidae familie, met name *Trypanosoma brucei*. Een uniek aspect van trypanosomen is dat een groot deel van hun glycolyse, en enkele andere cruciale stofwisselingsprocessen, zich afspelen in glycosomen. In andere organismen vinden deze processen altijd plaats in het cytosol. Glycosomen zijn organellen die verwant zijn aan de peroxisomen in andere eukaryote organismen. Research in voorgaande jaren heeft aangetoond dat, gedurende de levenscyclus van trypanosomen en gerelateerde protozoaire parasieten, de stofwisseling belangrijke veranderingen ondergaat. Deze veranderingen betreffen ook de samenstelling van de enzym inhoud van de glycosomen. Het UCL team heeft daarom de hypothese opgesteld dat glycosomen een belangrijke rol spelen in de aanpassing van de stofwisseling tijdens de opeenvolgende differentiatiestappen in de levenscyclus. Door centrale stofwisselingsprocessen te concentreren in deze organellen zou de parasiet zich snel en efficiënt kunnen aanpassen aan een nieuwe omgeving; organellen met een redundante enzym inhoud worden in hun geheel vernietigd door autofagie, en nieuwe organellen worden gesynthetiseerd met een andere enzym samenstelling, aangepast aan de nieuwe condities. Het onderzoek in dit IUAP project heeft zich toegespitst op de volgende aspecten: (1) Gebeurt turnover van glycosomen door middel van autofagie? Aangezien autofagie voordien niet beschreven was voor Trypanosomatidae werd eerst gekeken of de eiwitten verantwoordelijk voor dit proces voorkomen in deze organismen en vervolgens of er inderdaad verhoogde autofagie activiteit optreedt, met name van glycosomen, tijdens differentiatie. Moleculaire aspecten van autofagie werden bestudeerd. (2) Onderzoek werd verricht naar de moleculaire

mechanismen van glycosome biogenese, met name van de import van enzymen vanuit het cytosol in de matrix van glycosomen. (3) Het transport van substraten, producten, stofwisselingsintermediären en cofactoren door de glycosomale membraan werd gekarakteriseerd en een aantal verantwoordelijke eiwitten geïdentificeerd.

1.3.1. Autofagie in trypanosomen en de rol ervan in de turnover van glycosomen. Om te bepalen of autofagie optreedt in trypanosomen heeft de **UCL** groep eerst een homologie onderzoek verricht van de sequentiedatabases van *T. brucei* en de verwante parasieten *T. cruzi* en *Leishmania major*. Hierbij werden orthologe sequenties gevonden voor ongeveer 50% van de 40 *Saccharomyces cerevisiae* eiwitten waarvan bekend is dat ze betrokken zijn bij autofagie (ATGs = AuTofaGie-gerelateerde eiwitten). Ook werden er orthologe sequenties gevonden van gist eiwitten verantwoordelijk voor peroxisoom degradatie ('pexofagie'). Sterke experimentele aanwijzingen voor degradatie van glycosomen door autofagie werden vervolgens verkregen in morfologische studies – immunofluorescentie confocale microscopie en immunoelektronenmicroscopie – met gebruik van antisera voor karakteristieke eiwitten van glycosomen en het lysosoom. Waargenomen werd dat, zowel bij beperking van nutriënten als tijdens differentiatie van trypanosomen, een significante toename optrad in co-lokalisatie van glycosomen en het lysosoom. Bovendien was er een belangrijke, tijdelijke toename van het volume van het lysosoom.

Diverse *T. brucei* genen coderend voor eiwitten die waarschijnlijk betrokken zouden zijn bij autofagie en pexofagie werden vervolgens gekloneerd en de eiwitten bestudeerd: VPS34, ATG7, ATG8, ATG24 en VAC8. Het werk concentreerde zich met name op ATG8 en ATG24. ATG8 wordt algemeen beschouwd als de karakteristieke merker voor autofagosomen, de organellen waarin het te degraderen celmateriaal (cytosol en organellen) wordt omsloten om vervolgens aan het lysosoom voor degradatie geleverd te worden. Drie genen voor verschillende vormen van ATG8 werden in *T. brucei* gevonden: ATG8.1, 8.2 en 8.3. Voor zowel ATG8.1 als ATG8.2 werd aangetoond dat ze aanwezig zijn in autofagosomen onder condities waarin autofagie geïnduceerd wordt. Voor ATG24 kon inderdaad vastgesteld worden dat het een rol speelt in autofagie in trypanosomen. RNAi-afhankelijke vermindering van expressie van TbATG24 had een effect op de morfologie van het lysosoom in zowel bloedstroom- als procyclische insect-vorm parasieten. Maar het eiwit bleek ook betrokken te zijn bij endocytose. RNAi leidde tot een vermindering van transferrine opname in bloedstroom-vorm cellen. Vergelijkbare waarnemingen zijn door andere onderzoekers gedaan voor zoogdiercellen en gist. Voorts bleek de associatie van TbATG24 met endosomale membranen afhankelijk te zijn van de activiteit van de phosphoinositide 3-kinase (PI3K) TbVPS34 en gevoelig te zijn voor de PI3K remmer wortmannin, net als in gist. Interessant is de waarneming dat een afname van het TbATG24 niveau in de cel leidde tot een toename van het aantal autofagosomen en ook een toename van de differentiatiesnelheid van *T. brucei* cellen. Voorts werd waargenomen dat, na inductie van differentiatie van trypanosomen, glycosomen co-lokaliseren met autofagosomen die fluorescent gemarkeerd waren door expressie van hetzij een fusie-eiwit "Green-Fluorescent Protein" (GFP)-ATG8.1, hetzij GFP-ATG8.2 en bovendien dat, verrassenderwijze, de differentiatie significant sneller verliep in cellen die GFP-ATG8.2 tot expressie brachten dan cellen met GFP-ATG8.1.

1.3.2. Biogenese van glycosomen – import van glycosomale matrix eiwitten. Vroeger onderzoek van de **UCL** groep heeft aangetoond dat glycosomen authentieke peroxisomen zijn die echter gespecialiseerd zijn in glycolyse en andere centrale stofwisselingsprocessen. Daarom

werd verondersteld dat de biogenese van glycosomen vergelijkbaar zou zijn aan die van peroxisomen in gisten en zoogdiercellen. Bij de start van dit IUAP project waren ongeveer 30 eiwitten, genaamd peroxines (afgekort PEX), die betrokken zijn bij de biogenese van peroxisomen bekend. In de afgelopen jaren hebben we 12 homologe eiwitten voor *T. brucei* geïdentificeerd en aangetoond dat ze betrokken zijn bij de vorming van glycosomen; de meeste bij de import van matrix eiwitten: PEX1, 2, 4, 5, 6, 7, 10, 14 en 22, alsmede twee sterk verschillende vormen van PEX13, PEX13.1 en PEX13.2. Bovendien werd PEX19 ontdekt, waarvoor een rol in de insertie van eiwitten in de glycosomale membraan werd aangetoond. Onderzoekers elders identificeerden TbPEX11, verantwoordelijk voor proliferatie van glycosomen. Alle PEX eiwitten vertonen een grote sequentie diversiteit tussen organismen: trypanosoom peroxines zijn slechts < 15% tot maximaal 35% identiek aan de homologe eiwitten in gisten, planten- en zoogdiercellen.

Met het beschikbare repertoire aan PEX eiwitten heeft het onderzoek van de **UCL** groep zich geconcentreerd op de ontrafeling van het mechanisme van import van matrix eiwitten. Eiwitten die geïmporteerd moeten worden hebben (meestal) een C-terminaal type 1 “peroxisome-targeting signal” (PTS1) of een nabij de N-terminus gelegen PTS2. Deze eiwitten worden gesynthetiseerd in het cytosol en vervolgens herkend door cytosolische receptoren, respectievelijk PEX5 en PEX7. Met het cargo PTS eiwit gebonden dokt de receptor op een glycosomaal membraancomplex bestaande uit tenminste PEX14, PEX13.1 en PEX13.2. Dit leidt vervolgens tot een associatie van PEX5 met het membraan. Voor gist peroxisomen is aangetoond dat PEX5 een transitair kanaal in de membraan vormt waardoor het PTS eiwit in de matrix geleverd wordt. Het mechanisme waarmee PEX7 PTS2 eiwitten aflevert is nog niet opgehelderd. Het **UCL** onderzoek heeft aangetoond dat TbPEX7 bindt aan TbPEX5. Na levering van het PTS1 eiwit in de matrix wordt PEX5 gerecupereerd uit de glycosomale membraan om nieuwe cycli van PTS1-eiwit import te katalyseren. Daartoe wordt het eerst gemarkeerd door ubiquitineren. Dit gebeurt door het ubiquitine-conjugerende enzym PEX4 dat aan de cytosolische kant van de membraan verankerd is door PEX22 en een membraan-gebonden complex van ubiquitine-ligerende enzymen bestaande uit PEX2, 10 en 12. Vervolgens wordt het ge-ubiquitineerde PEX5 uit de membraan getrokken door een complex van twee AAA⁺-ATPases, PEX1 en 6. PEX5 dat slechts met slechts één of een paar ubiquitine moleculen gemodificeerd is wordt ontdaan van deze modificatie door een nog te identificeren enzym (of niet enzymatisch) en is daarna beschikbaar voor nieuwe cycli van import, terwijl veelvoudig ubiquitineren functioneert als een signaal voor beschadigd of overmaat PEX5 en leidt tot degradatie van dergelijk PEX5 door proteasomen.

Hoewel het matrix eiwit import proces in grote lijnen geconserveerd is tussen peroxisomen van gisten, planten- en zoogdiercellen enerzijds en glycosomen van trypanosomen anderzijds, zijn er aanzienlijke verschillen in details zoals de domeinen van peroxines die met elkaar interacties ondergaan, residuen die essentieel zijn voor interacties of andere activiteiten, etc. Deze verschillen, samen met de geringe mate van totale sequentie identiteit en het feit dat alle geanalyseerde *T. brucei* peroxines van essentieel belang zijn gebleken voor correcte glycosoom biogenese en overleving van de parasieten, zijn veelbelovend voor de mogelijkheid om deze eiwitten te gebruiken als targets voor medicijn ontwikkeling tegen de slaapziekte veroorzaakt door de trypanosomen. Onderzoek in deze richting wordt voortgezet.

1.3.3. Het derde onderzoeksluik van het **UCL** team betreft het identificeren en karakteriseren van het mechanisme waarmee substraten, producten, stofwisselingsintermediären en cofactoren door de glycosomale membraan passeren en waarmee aldus de trypanosomen hun stofwisseling kunnen aanpassen tijdens differentiatie. Gedurende de project periode heeft het team drie ABC transport eiwitten – met de halve grootte ten opzichte van de gebruikelijke ‘dubbele’ ABC transporteurs – geïdentificeerd en ten dele gekarakteriseerd. Deze eiwitten, genaamd “Glycosomal ABC Transporters” of GAT1-3, hebben een topologie in de membraan die aantoont dat cytosolisch ATP gebruikt wordt om verbindingen te importeren in het organel. Voor GAT1 werd aangetoond dat oleoyl-CoA het substraat is. Dit grote vetzuur molecuul wordt in het glycosoom waarschijnlijk gebruikt voor β -oxidatie en/of ether-lipide biosynthese. De substraten voor GAT2 en GAT3 zijn nog onbekend. GAT1 en 3 komen tot expressie in zowel bloedstroom en procyclische trypanosomen, GAT2 alleen in de bloedstroom vorm.

Voorts werd het bestaan van verschillende soorten poriën in de glycosomale membraan aannemelijk gemaakt. Wanneer eiwitten van membranen van hoog-gezuiverde glycosoom preparaten werden opgelost in detergentia en vervolgens toegevoegd aan een lipide membraan vormden zich spontaan poriën die aangetoond kon worden met elektrofysiologische technieken. Voornamelijk drie soorten poriën konden onderscheiden worden op basis van verschillende stroomsterktes bij gefixeerde spanningsverschillen over de membraan en de aanwezigheid van specifieke zouten en ionensterktes. Elk van deze poriën was in een open toestand over een elektrische potentiaal spanne van +150 tot –150 mV. Eén van de poriën had een drievoudige selectiviteit voor anionen over kationen, terwijl de twee andere poriën een lichte selectiviteit toonden voor kationen. De verkregen resultaten verschaffen sterke aanwijzingen dat substraten, producten of metabolieten met een moleculair gewicht tot ongeveer 500 Da de glycosomale membraan kunnen passeren via deze weinig selectieve poriën, terwijl grotere verbindingen (ATP, NAD(P), acyl-CoAs) transport eiwitten nodig hebben, zoals de GAT eiwitten, of andere transporteurs die nog geïdentificeerd zouden kunnen worden zoals de moleculen van de “Mitochondrial Carrier Family” die aangetoond zijn in peroxisomale membranen en daar een brede specificiteit blijken te hebben voor grote moleculen zoals diverse cofactoren.

De aanwezigheid van weinig selectieve poriën enerzijds en eerder verkregen aanwijzingen voor een schijnbare functie voor de glycosomale membraan als permeabiliteitsbarrière, ook voor metabolieten, lijken een paradox te vormen. Diverse verklaringen zijn mogelijk: (i) de enzymen binnen het glycosoom vormen een multienzyme complex waarbinnen de intermediären direct van katalytische site naar katalytische site verplaatsen met weinig uitwisseling met de omgeving (“metabolic channelling”); (ii) de merendeels negatieve stofwisselingsintermediären equilibreren langzaam over de membraan vanwege het bestaan van een Donnan potentiaal veroorzaakt door de hogere pK waardes van de glycosomale eiwitten ten opzichte van die in het cytosol; (iii) de opening van de poriën wordt gereguleerd door specifieke eiwitten or door associatie met de enzymen. Experimentele data zijn beschikbaar die elk van deze mogelijkheden ondersteunen; inderdaad, de verschillende mogelijkheden sluiten elkaar niet wederzijds uit. Het is belangrijk te realiseren dat de aanwezigheid van poriën, waarvan de selectiviteit voornamelijk berust op hun diameter, een nieuw criterium stelt voor de grootte en fysicochemische eigenschappen van te ontwikkelen

remmers van de glycosomale enzymen voor mogelijk gebruik als potentiële geneesmiddelen voor slaapziekte.

1.4. Résultats de l'ITG.

La glande salivaire d'une mouche tsé-tsé (*Glossina*) constitue le microenvironnement où les parasites se différencient au stade final (formes métacycliques). Lorsqu'une mouche infectée sonde la peau de l'hôte pour se nourrir, les parasites sont co-injectés avec la salive. L'ITG s'est concentré sur la caractérisation des protéines des glandes salivaires pour établir leurs fonctions dans le processus d'engorgement de la mouche tsé-tsé, dans le développement du trypanosome dans le vecteur et dans l'immunomodulation dans l'hôte mammifère.

1.4.1. Etude du sialome de la mouche tsé-tsé (ITG, VUB, ULB). La salive d'une mouche tsé-tsé est modérément alcaline (pH 8,0), très riche en protéines (approximativement 4 µg de protéines par glande salivaire) et caractérisée par la présence constante des protéines salivaires majeures. Trois nouvelles séquences d'ADNc, codant pour des protéines salivaires sécrétées de fonction encore inconnue ont été sélectionnées à partir d'une bibliothèque d'expression λgt11- ADNc glandes salivaires : une protéine riche en glycine/glutamate (Gmmsgp1) de 8,3 kDa, une protéine riche en proline (Gmmsgp2) de 12,0 kDa et une protéine composée d'une partie 'metallophosphoestérase/5'nucléotidase' et d'une région riche en glutamate /aspartate /asparagine (Gmmsgp3) de 97,4 kDa. Une analyse détaillée du transcriptome des glandes salivaires (> 20.000 ESTs) montre que le sialome de mouche tsé-tsé est très complexe avec une présence potentielle de plus de 250 protéines qui sont probablement associées au repas sanguin. Basé sur leur activité potentielle, certaines de ces familles de protéines pourraient être impliquées dans la migration des trypanosomes vers les glandes salivaires ou encore dans le contrôle de la croissance et de la différenciation du parasite: TAG5, les apyrases (5'Nucléotidase et Gmmsgp3) et les protéines Tsal.

1.4.2. Etudes fonctionnelles de TAG5 (ITG, VUB). Cette protéine appartient à la famille CAP (protéines sécrétoires riches en cystéine) dont l'activité biologique est encore inconnue. Nous avons démontré que la salive de tsé-tsé et la protéine recombinante TAG5 peuvent sensibiliser des souris invalidées pour le gène TLR-2/4, provoquer une réponse d'IgE spécifique et causer la dégranulation des mastocytes. Cette réponse d'hypersensibilité pourrait faciliter la migration des formes métacycliques des trypanosomes inoculés en intradermique chez l'hôte mammifère. De plus, nous avons démontré que la protéine TAG5 possède des propriétés proches de celles des immunoglobulines et similaires aux protéines présentes dans la salive des stomoxes et de plusieurs espèces de tiques.

1.4.3. Etudes fonctionnelles d'une apyrase salivaire (5'Nuc) (ITG, VUB). Cette protéine est exclusivement transcrite dans la glande salivaire et appartient à la famille des 5'nucléotidases. Cette protéine de 65 kDa est soluble, glycosylée et présente une activité anti-hémostatique basée d'une part sur une activité d'apyrase (la dégradation d'ATP et ADP) et d'autre part sur une activité antagoniste d'un récepteur de fibrinogène (GPIIb/IIIa). Conformément à ces caractéristiques, l'activité de 5'nucléotidase a puissamment freiné l'agrégation des thrombocytes. La suppression in vivo de l'expression de cette protéine par des ARN inhibiteurs spécifiques a provoqué une réduction de 50% de l'activité antithrombotique de la salive ainsi qu'une perturbation du repas de la mouche sur l'hôte mammifère.

1.4.4. Etudes fonctionnelles des protéines salivaires Tsal 1 et 2 (**ITG, VUB**). La famille des gènes codant pour les protéines salivaires Tsal sont des protéines abondantes (>40% du contenu de la salive) qui présentent une importante similarité de séquence et une homologie structurale avec une endonucléase de crevette (*Marsupenaeus japonicus*). Les protéines Tsal recombinantes ont montré une affinité non-spécifique pour l'ADN/ARN avec des valeurs de Kd de l'ordre du nanomolaire et une affinité non-exclusive pour l'ADN duplex (ou double brin). Les protéines Tsal de la salive de mouche tsé-tsé exercent une faible activité de nucléase avec une forte préférence pour l'ADN duplex dans une large gamme de pH (pH 3,5 – 8,0). L'effet du pH sur l'activité enzymatique est étroitement lié à l'inhibition par les sels. La suppression d'expression de cette protéine par l'utilisation d'ARN inhibiteurs spécifiques dans la mouche tsé-tsé a révélé un phénotype caractérisé par une plus faible digestion du repas sanguin confirmant le rôle de ces enzymes Tsal dans ce processus.

1.4.5. Etudes expérimentales de la modification de la composition salivaire par *Trypanosoma brucei* (**ITG, VUB**). La fréquence de contact entre les mouches infectées et les hôtes mammifères constitue un déterminant majeur de la dynamique de transmission du parasite *T. brucei*. Les résultats de notre étude expérimentale suggèrent que le parasite favorise sa transmission par la manipulation du comportement alimentaire des glossines en modifiant la composition de leur salive. En effet, les mouches infectées par *T. brucei* dans les glandes salivaires montrent une durée de repas significativement prolongée (>1 min de plus). La comparaison des deux activités anti-hémostatiques majeures c.-à-d. l'inhibition de l'agrégation plaquettaire et l'activité anticoagulante par inhibition de la thrombine entre mouches infectées et non infectées démontre clairement une suppression significative de ces activités à la suite à l'infection de la mouche. Cet effet est principalement corrélé à une forte réduction de la transcription des gènes salivaires résultant en une forte diminution de la concentration en protéines et donc des différentes activités biologiques qui y sont liées. Ces données fournissent la preuve d'une modification de la composition salivaire par la présence des trypanosomes qui résultent en une activité anti-hémostatique fortement réduite et un changement de comportement alimentaire qui pourraient mener à une augmentation du contact vecteurs/hôtes et par conséquent, à une augmentation de la transmission des parasites dans les conditions naturelles.

1.4.6 L'adaptation du métabolisme des trypanosomes à l'environnement de l'intestin de la mouche tsé-tsé (**LMUM, ITG**).

Partant de l'hypothèse que les changements du métabolisme énergétique se déroulant au cours du cycle de développement parasitaire sont déclenchés par la disponibilité de sources de carbone, non seulement entre stades sanguicoles et stades du tube digestif de la mouche mais aussi entre le tube digestif et les glandes salivaires de la mouche, nous avons montré que la glycosomal isocitrate dehydrogenase (IDHg) est essentielle au développement au-delà du stade proventriculaire. Par ailleurs exactement le même phénotype de transmission cyclique a été observé avec des lignées de parasites KO pour l'aconitase. Ceci suggère que la génération de NADPH dans le glycosome à partir de citrate mitochondrial est essentielle dans des conditions dépourvues de glucose. Des évidences préliminaires suggèrent que le NADPH est requis pour la β -oxydation glycosomale des acides gras polyinsaturés, un processus seulement utilisé en conditions de privation de nutriments.

1.4.7. Recherche d'une méthodologie expérimentale alternative pour étudier les interactions entre les trypanosomes et la mouche tsé-tsé : la production de nanocorps (Nb) par un endosymbionte bactérien de la mouche tsé-tsé (**ITG,VUB**). Les communications moléculaires entre parasites et vecteur qui orchestrent le développement des trypanosomes dans la mouche tsé-tsé restent inexplorées en raison de la disponibilité limitée d'outils expérimentaux pour la recherche fonctionnelle. En effet, la biologie vivipare de l'insecte accompagnée d'une progéniture limitée a exclu l'application des techniques de mutagenèse standard et d'approches transgéniques. L'utilisation d'ARN inhibiteurs par micro-injection d'ARN double brin est la méthode la plus courante pour l'annotation fonctionnelle de gènes de la mouche tsé-tsé. Toutefois, une injection d'ARN double brin provoque seulement une suppression temporaire de l'activité d'un gène par une activation du système immunitaire de l'insecte. Ceci est donc loin d'être optimal pour étudier les interactions moléculaires entre parasite et vecteur. Une approche paratransgénique qui utilise l'endosymbionte *Sodalis glossinidius* de la mouche tsé-tsé pour produire des nanocorps ciblant le dialogue moléculaire hôte/parasite pourrait offrir une nouvelle méthodologie pour étudier les déterminants de cette association spécifique. Une nouvelle stratégie pour activer l'expression de gènes étrangers dans *Sodalis* a été optimisée à IMT. Nous avons démontré que la voie de translocation basée sur la séquence signal dite 'twin-arginine' (Twin Arginine Translocation-pathway) est également fonctionnelle chez *Sodalis* avec un potentiel pour exporter les protéines actives au travers de la membrane périplasmique. Ensuite, nous avons transformé avec succès *S. glossinidius* pour exprimer un nanocorps, le Nb_An33, qui cible une épitope du VSG de *T. brucei* Antat 1.1. Nous avons montré que le peptide pelB réussissait à diriger l'exportation du Nb_An33 au travers de la membrane périplasmique de *S. glossinidius* avec des niveaux de flux intra/extracellulaires significatifs. La population d'endosymbiontes exprimant le pelBNb_An33 présente une taux de croissance similaire à celui des *Sodalis* de type sauvage. Ces données constituent la première démonstration de l'expression et de l'efflux cellulaire d'un nanocorps fonctionnel à activité antiparasitaire dans un endosymbionte bactérien de la mouche tsé-tsé. De plus, les *Sodalis* transformés n'ont pas été affectés dans leur croissance, suggérant qu'ils peuvent se montrer compétitifs avec la flore microbienne endogène dans l'intestin moyen de la mouche. Collectivement, ces données renforcent le potentiel de *S. glossinidius* d'être transformé en organisme de plateforme 'paratransgénique'.

1.5. Résultats de LMUM

Le rôle des adénylate cyclases dans les relations hôte-parasite a été étudié en collaboration avec les groupes de l'**ULB** et de la **VUB** (voir 1.1.6 et 1.2.6). En focalisant les recherches sur le rôle de la signalisation du cAMP dans le parasite, nous avons mis en évidence la fonction critique de l'activité des cyclases et donc du cAMP dans la cytocinèse. Nous avons montré que la protéine kinase A (PKA), une cible possible de cette signalisation, était en fait insensible au cAMP. Nous avons combiné des recherches de ligands alternatifs possibles sur la sous-unité régulatrice, incluant des expériences de mutagenèse dirigée de la poche fixant les cNMP et des essais d'activité kinase de la PKA recombinante du trypanosome. Nous avons identifié un inhibiteur et des activateurs puissants de cette PKA, suggérant la présence d'un messenger secondaire alternatif pour cette kinase chez les kinétoplastidés. En outre, nous avons montré que cette PKA

était spécifiquement activée in vivo par un choc thermique froid, un signal environnemental important qui décide de la différenciation cellulaire chez *T. brucei*. Des études des sous-unités R et C de la PKA par génétique inverse dans une lignée de trypanosomes pléomorphes ont permis de confirmer que la PKA est importante pour la sensibilité au citrate des formes stumpy, et pour l'efficacité de la différenciation des formes slender en formes stumpy.

2. Publications significatives du consortium

Vanhollebeke, B., Nielsen, M. J., Watanabe, Y., Truc, P., Vanhamme, L., Nakajima, K., Moestrup, S.K., and Pays, E. (2007) Distinct roles of haptoglobin-related protein and apolipoprotein L-I in trypanolysis by human serum. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 104, 4118-4123.

Lecordier, L., Devaux, S., Uzureau, P., Dierick, J.F., Walgraffe, D., Poelvoorde, P., Pays, E., and Vanhamme, L. (2007) Characterization of a TFIID homologue from *Trypanosoma brucei*. **Mol. Microbiol.** 64, 1164-1181.

Engstler, M., Pfohl, T., Herminghaus, S., Boshart, M., Wiegertjes, G., Heddergott, N., and Overath, P. (2007) Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. **Cell** 131, 505-15.

Vanhollebeke, B., Demuylder, G., Nielsen, M.J., Pays, A., Tebabi, P., Dieu, M., Raes, M., Moestrup, S.K., and Pays, E. (2008) A haptoglobin-hemoglobin receptor conveys innate immunity to *Trypanosoma brucei* in humans. **Science** 320, 677-681.

Herman M, Pérez-Morga D, Schtickzelle N, and Michels PA. (2008) Turnover of glycosomes during life-cycle differentiation of *Trypanosoma brucei*. **Autophagy** 4, 294-308.

Gómez-Rodríguez, J., Beschin, A., Korf, H., Brys, L., Berberof, M., Stijlemans, B., De Muylder, G., Darji, A., Pays, E., and De Baetselier, P. (2009) Identification of a parasitic immunomodulatory protein triggering the development of suppressive M1 macrophages during African trypanosomiasis. **J. Inf. Dis.** 200, 1849-1860.

Lecordier, L., Vanhollebeke, B., Poelvoorde, P., Tebabi, P., Andris, F., Lins, L. and Pays, E. (2009) C-terminal mutants of apolipoprotein L-I efficiently kill both *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **PLoS Pathogens** 5, e1000685.

Rivière L, Moreau, P, Allmann, S, Hahn, M, Biran, M, Plazolles, N, Franconi, JM, Boshart, M and Bringaud, F. (2009) Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA** 106, 12694-12699.

Vanhollebeke, B., and Pays, E. (2010) The trypanolytic factor of human serum: many ways to enter the parasite, a single way to kill. **Mol. Microbiol.** 76, 806-814.

Genovese, G., Friedman, D.J., Ross, M.D., Lecordier, L., Uzureau, P., Freedman, B.I., Bowden, D.W., Langefeld, C.D., Oleksyk, T.K., Knob, A.U., Bernhardt, A., Hicks, P.J., Appel, G.B., Nelson, G.W., Vanhollebeke, B., Winkler, C.A., Kopp, J.B., Pays, E., and Pollak, M.R. (2010) Association of trypanolytic apoL1 variants with kidney disease in African-Americans. **Science** 329, 841-845.

Bosschaerts, T., Guilliams, M., Stijlemans, B., Morias, Y., Engel, D., Tacke, F., Hérin, M., De Baetselier, P., and Beschin, A. (2010) Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. **PLoS Pathogens** 6(8). pii: e1001045.

Caljon G., De Ridder K., De Baetselier P., Coosemans M., and Van Den Abbeele J. (2010) Identification of a tsetse salivary protein with dual inhibitory action on human platelet aggregation. **PLoS ONE**, 5 (3): e9671.doi:10.1371/journal.pone.0009671.

Van Den Abbeele J., Caljon G., De Ridder K., De Baetselier P., and Coosemans M. (2010) *Trypanosoma brucei* modifies the tsetse salivary composition, altering the fly feeding behavior that favors parasite transmission. **PLoS Pathogens**, 6:e1000926.

Stijlemans, B., Natesan, S.K.A., Saerens, D., Conrath, K., Pérez-Morga, D., Skepper, J., Caljon, J., Nikolaou, A., Brys, L., Pays, E., Magez, S, Field, M.C., De Baetselier, P. and Muyldermans, S. (2011) High affinity nanobodies against the *Trypanosoma brucei* VSG are potent trypanolytic agents that block endocytosis. **PLoS Pathogens** 7, e1002072.

Bockstal, V., Guirnalda, P., Caljon, G., Goenka, R., Telfer, J., Frenkel, D., Radwanska, M., Magez, S., and Black, S.J. (2011) *T. brucei* infections cause reduced B lymphocyte maturation in bone marrow and truncate compensatory splenic lymphopoiesis through the induction of apoptosis of transitional B-cells. **PLoS Pathogens** 7(6):e1002089.

Salmon, D., Bachmaier, S., Krumbholz, C., Kador, M., Gossmann, J.A., Uzureau, P., Pays, E. and Boshart, M. (2012) Cytokinesis of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms depends on expression of adenylyl cyclases of the ESAG4 or ESAG4-like subfamily. **Mol. Microbiol.** 84, 225-242.

De Vooght L., Caljon G., Stijlemans B., De Baetselier P., Coosemans M., and Van Den Abbeele J. (2012) Expression and extracellular release of a functional anti-trypanosome Nanobody in *Sodalis glossinidius*, a bacterial symbiont of the tsetse fly. **Microbial Cell Factories** 11:23