

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté

par

Pascal Grébaut

pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**ETUDE PROTEOMIQUE DES FACTEURS EXCRETES/SECRETES AU
COURS DES INFECTIONS A *TRYPANOSOMA CONGOLENSE***

soutenu le 24 novembre 2008

devant le jury suivant :

<i>Pr. Thierry Dupressoir</i>	- Président
<i>Dr. Geneviève Milon</i>	- Rapporteur
<i>Dr. Philippe Bastin</i>	- Examineur
<i>Pr. Yves Benyamin</i>	- Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Dr. G. Cuny et Dr. P. Holzmuller (tuteur)

Laboratoire de :

*Laboratoire de Recherche et de Coordination contre les Trypanosomoses (LRCT)
UMR 177 « Interactions Hôte-Vecteur-Parasite dans les Trypanosomoses » IRD/CIRAD
TA 207G Campus International de Baillarguet
34398 MONTPELLIER CEDEX 5*

Directeur : Dr. G. Cuny

et de

Pr. Y. Benyamin

Laboratoire de :

*Motilité cellulaire – UMR5539
Université Montpellier II
Place Eugène Bataillon
34095 MONTPELLIER CEDEX 5*

Directeur : Pr. Y. Benyamin

EPHE (Sciences de la Vie et de la Terre)

Remerciements

Je remercie les membres du jury, en particulier Geneviève Milon et Philippe Bastin, pour l'honneur qu'ils me font d'avoir accepté de juger mon travail et de consacrer une partie de leur temps pour participer à ma soutenance. Je remercie aussi mes professeurs de l'EPHE, Yves Benyamin et Thierry Dupressoir, pour m'avoir accompagné tout au long des cinq années qu'aura duré ma formation et la préparation du diplôme à l'EPHE.

Toute ma reconnaissance va à mon directeur d'unité, Gérard Cuny, pour la confiance et la liberté qu'il m'a toujours accordées dans mon travail, mais aussi pour les moyens qu'il n'a jamais hésité à mettre à ma disposition, que ce soit dans la réalisation du programme de recherche EPHE ou dans les autres projets où j'étais impliqué.

Un grand merci à Philippe Holzmuller qui, par son dynamisme, sa motivation et son professionnalisme est arrivé à faire de mon projet initial un projet ambitieux qui débouche aujourd'hui sur des perspectives prometteuses pour la lutte contre les trypanosomoses africaines. Par ailleurs je le remercie aussi, au même titre que Paul Chuchana, pour la patience, la persévérance et le niveau d'exigence dont ils ont fait preuve lors de la rédaction de ce mémoire.

Toute ma gratitude va à Jean-Paul Brizard, Christophe Brugidou à l'IRD ; Martial Séveno, Edith Demette et Patrick Join à l'IGF ; Jean-Benoît Peltier et Michel Rossignol à l'INRA, tous « Protéomistes » ou « Massistes » qui m'ont gentiment accueilli sur leurs plate-formes protéomiques respectives et ont ainsi permis d'obtenir les identifications qui font la richesse de cette étude.

Je remercie tous les autres collègues du LRCT pour leur patience et leur compréhension face à mon manque de disponibilité quand je me suis lancé dans la rédaction du manuscrit. Parmi eux, j'envoie un petit clin d'œil complice à mon « collègue » Stef, pour les instants de rigolades passés autour d'un café et qui m'ont permis de mieux supporter la pression.

Un gros bisou à mon épouse, Véronique, ainsi qu'à mes trois enfants Juliette, Joséphine et Félix, qui ont eu à supporter parfois un mari et un papa plutôt préoccupé par des manips de sécrétion ou des problèmes de rédaction.

Enfin, je voudrais dédier ce mémoire à mon père, Serge Grébaud, décédé il ya deux ans. C'est par son engagement en tant que technicien de la coopération française en Afrique, que j'ai pu grandir en Afrique et être sensibilisé aux difficultés de développement de ce continent.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	3
GLOSSAIRE	5
FIGURES ET TABLEAUX	8
AVANT-PROPOS	10
INTRODUCTION.....	12
CHAPITRE I. ETAT DES CONNAISSANCES	14
1.1 Le système pathogène	14
1.1.1 L'agent étiologique	14
1.1.1.1 Taxonomie	14
1.1.1.2 Morphologie.....	17
1.1.1.3 Cycle évolutif	18
1.1.2 Pathologie	21
1.1.2.1 Symptomatologie	21
1.1.2.2 Physiopathologie	21
1.1.2.3 Réponse immunitaire de l'hôte	22
1.1.2.4 Mécanismes d'échappement du parasite	24
1.2 Justifications du modèle de l'étude	26
1.2.1 Choix de la trypanosomose à <i>T. congolense</i>	26
1.2.2 Pourquoi la protéomique ?.....	27
CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES	30
2.1 Matériel Biologique	30
2.1.1 Infections expérimentales bovines.....	30
2.1.2 Production parasitaire	31
2.1.3 Sécrétions.....	33
2.2 Analyse protéomique	37
2.2.1 Caractérisation systématique des ES.....	37
2.2.2 Approche comparative des sécrétomes et des protéomes.....	40
CHAPITRE III. RESULTATS.....	44
3.1 Données Biologiques	44
3.1.1 Suivis des infections à <i>T. congolense</i> chez le bovin	44
3.1.2 Paramètres observés chez les rongeurs	47

3.2 Contrôle de qualité du sécrétome	49
3.2.1 Dosage de protéines.....	51
3.3 Caractérisation moléculaire des protéines du sécrétome	53
3.4 Aspects fonctionnels des protéines caractérisées.....	56
3.5 Caractérisation moléculaire du différentiel d'expression des sécrétomes et des protéomes	59
3.5.1 Sécrétomes.....	59
3.5.2 Protéomes	65
3.6 Comparaison sécrétome-protéome : validation de l'analyse du sécrétome.....	69
3.7 Comparaison des deux clones parasites au travers de leur sécrétome	71
3.8 Immuno-empreintes différentielles des sécrétomes et des protéomes	74
3.8.1 Immuno-empreintes 1-D du sécrétome et du protéome d'IL3000.....	74
3.8.2 Immuno-empreintes 2-D du protéome d'IL3000	75
CHAPITRE IV. DISCUSSION	77
4.1 Développement d'une méthode standardisée pour l'étude des protéines excrétées/sécrétées et constitutives de <i>T. congolense</i>	78
4.1.1 Importance d'un échantillonnage standardisé.....	78
4.1.2 Intérêts d'une approche protéomique diversifiée	79
4.2 IL1180 et IL3000 : deux clones, deux comportements biologiques.....	81
4.3 Caractérisation moléculaire des protéines excrétées/sécrétées et constitutives de <i>T. congolense</i>	82
4.3.1 Validation du sécrétome par l'analyse du protéome	82
4.3.2 Protéines d'intérêt issues de l'approche exhaustive.....	83
4.3.3 Protéines d'intérêt issues de l'approche différentielle	85
4.3.4 Comparaison des sécrétomes et enjeux stratégiques pour <i>T. congolense</i>	89
4.3.5 Profils sérologiques liés à la trypanosusceptibilité.....	90
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	92
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	94

LISTE DES ABREVIATIONS

ACMO	Agent Chargé de la Mise en Œuvre des mesures d'hygiène et sécurité
ATP / ADP	Adénosine TriPhosphate / Adénosine DiPhosphate
CIRAD	Centre de coopération Internationale en Recherche Agronomique
CIRDES	Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide
DEAE-cellulose	diéthylaminoéthylcellulose
DIGE	Difference Gel Electrophoresis
DTT	Dithiothréitol
FAO	Food and Agriculture Organization (of the United Nations)
HPLC	High-performance liquid chromatography (or High pressure liquid chromatography)
IEF	Iso Electric Focusing
IGF	Institut de Génomique Fonctionnelle
ILRI	International Livestock Research Institute
INCO-DEV	International Cooperation – Développement
INF gamma	Interféron gamma
INRA	Institut National de Recherche Agronomique
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
LEGET	Laboratoire d'Etude des Grandes Endémies Tropicales
LRCT	Laboratoire de Recherche et de Coordination sur les Trypanosomoses
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight
MS	Mass Spectrometry
NFS	Numération de la Formule Sanguine
NLS	Lauroylsarcosinate de sodium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

PAAT	Programme Against African Trypanosomiasis
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCV	Packed Cell Volume
PES	Protéines Excrétées / Sécrétées
PSG	Tampon Phosphate Saline Glucose
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RDC	République Démocratique du Congo
RE	Réticulum Endoplasmique
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis
SIDA / HIV	Syndrôme ImmunoDéficient Acquis / Human Immunodeficiency Virus
SOPF	Specific and Opportunistic Pathogen Free
TBS	Tris Buffer Saline
TCA	Trichloroacetic Acid
THA	Trypanosomiase Humaine Africaine
THF	Tétrahydrofuran
TNF alpha	Tumour Necrosis Factor alpha
UMR	Unité Mixte de Recherche
VSG	Variable Surface Antigen

GLOSSAIRE

Ataxie : en médecine, l'ataxie (du grec ataxiā, signifiant « désordre ») est une pathologie neuromusculaire qui consiste en un manque de coordination fine des mouvements volontaires liée à une atteinte du système nerveux.

Buffy Coat : fraction d'un échantillon de sang non coagulé après centrifugation qui contient la plupart des globules blancs et des plaquettes.

Cachexie : affaiblissement profond de l'organisme (perte de poids, atrophie musculaire, etc.), lié à une dénutrition très importante.

Clone : ensemble des individus avec des caractéristiques génétiques identiques dérivant du même ancêtre commun, que leur existence soit naturelle ou artificielle. Chez les trypanosomes, il y a coexistence de lignées évolutives indépendantes qui présentent une structure fondamentalement clonale.

Compartment cellulaire : ensemble des éléments moléculaires regroupés au sein d'une organelle. Le sécrétome est un cas particulier, puisqu'il s'agit d'un compartiment extracellulaire regroupant les éléments moléculaires du Soi par opposition aux éléments environnementaux (non Soi).

Désolvatation : l'échantillon à analyser en spectrométrie de masse est en phase gazeuse. Le processus de volatilisation met l'échantillon en phase gazeuse sans décomposition. On dira d'un composé solide qu'il est « désorbé » tandis qu'un composé en solution est « désolvaté ».

Espace endopéritrophique : chez les insectes, la membrane péritrophique délimite deux zones du tube digestif médian (l'espace endopéritrophique et l'espace ectopéritrophique). Cette membrane est constituée d'un entrelacs de fibrilles de chitine pris dans une matrice de glycoprotéines. Elle est issue, dans la majorité des cas, de la condensation de sécrétions de l'épithélium du tube digestif médian.

Hypocomplémentémie : déficit des composants de la cascade du système du complément, qui joue un rôle important comme anti infectieux et dans l'élimination des complexes immuns. Il existe 2 types d'hypocomplémentémie : héréditaire et acquise par consommation, qui peut être causée par l'activation incontrôlée de certains de ses composants.

Ionisation : action qui consiste à enlever ou ajouter des charges à un atome ou une molécule. L'atome - ou la molécule - en perdant ou en gagnant des charges n'est plus neutre électriquement, il est alors appelé ion.

Kinétoplaste : (kinéto-, du gr. κινητός «mobile, qu'on peut mouvoir»), organelle apparenté aux mitochondries, propre à certains protozoaires flagellés. Il possède son propre matériel génétique, l'ADN kinétoplastique, organisé sous forme de maxi et mini cercles.

Leucopénie : déficit du nombre de leucocytes (c'est-à-dire de globules blancs) dans le sang (moins de 4000 éléments/mm³ ou 4 milliards/litres chez l'homme).

Métacytogénèse : processus par lequel les formes épimastigotes non infectantes se transforment en formes trypomastigotes métacycliques infectantes, ou formes du parasite transmissible à l'hôte définitif.

Nébulisation : projection de liquide sous forme de gouttelettes très fines.

Parésie locomotrice : déficit moteur défini par une perte partielle des capacités motrices d'une partie du corps (limitation de mouvement, diminution de la force musculaire), parfois transitoire d'un ou de plusieurs muscles par opposition à la paralysie, qui est elle caractérisée par la perte totale de motricité d'une partie du corps.

Pathogénèse : Ensemble des mécanismes responsables du déclenchement et du développement d'une maladie. Elle insiste sur le déroulement et les processus mis en jeu par l'organisme et le psychisme au cours d'une maladie. Sa valeur médicale demeure centrale pour le clinicien lorsqu'il effectue un diagnostic et surtout un pronostic.

Pathogénicité : pouvoir d'un organisme vivant (virus, bactéries, parasites...) à induire la symptomatologie clinique d'une maladie.

Pica : trouble du comportement alimentaire caractérisé par l'ingestion durable (plus d'un mois) de substances non nutritives (terre, craie, sable, papier, etc.).

Splénomégalie : augmentation du volume (mégalie) de la rate (spléno), repérable à la palpation.

Système hématopoïétique : ensemble de production des éléments figurés du sang.

Trypanotolérance : « La trypanotolérance peut être définie comme une aptitude à limiter l'ampleur et la fréquence des parasitémies et à faire preuve d'une sensibilité réduite aux effets pathogènes des trypanosomes » (d'après ITARD, 1981). Chez le bovin, l'existence de races naturellement trypanotolérantes, suggère fortement une composante génétique de ce caractère.

Virulence : d'après les sources conventionnelles, caractérise ce qui est hautement infectieux, malin, voire mortel. Dans le cadre des trypanosomoses, nous définissons la virulence comme la capacité du parasite à se développer chez son hôte (Andrade *et al.*, 1985 ; Devera *et al.*, 2003) .

FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1. Taxonomie des trypanosomes de mammifères (d'après Hoare, 1972 ; réactualisée pour le sous-genre *Nannomonas*).
- Tableau I. Caractérisation des espèces et génotypes du sous-genre *Nannomonas* ; d'après Gibson (2003).
- Figure 2. Architecture cellulaire du Trypanosome. Représentation simplifiée de la localisation des principaux éléments de la structure cellulaire, d'après Matthews (2005).
- Figure 3. Changement de position du kinétoplaste pendant le cycle cellulaire. (A) position relative du kinétoplaste chez les trypomastigotes sanguicoles, les formes procycliques et épimastigotes par rapport au noyau et à l'extrémité postérieure du trypanosome. (B) Image en contraste de phase de formes sanguicoles en cours de transformation formes procycliques. Position du noyau (N) et du kinétoplaste (K). D'après Matthews (2005). Echelle, 20 µm.
- Figure 4. Cycle des *Nannomonas* chez la glossine vectrice (d'après Cuisance, 2000). (1) repas de sang, (2) installation des trypanosomes dans l'intestin moyen et transformation en procyclique après un court passage dans le jabot, (3) migration vers le proboscis en passant par l'espace ectopéritrophique et le proventricule, (4) passage dans l'hypopharynx et transformation en métacyclique.
- Figure 5. Bovins trypanosomés (© D. Cuisance)
- Figure 6. Vue schématique de la partie postérieure d'un trypomastigote sanguicole de *T. brucei* sl. CCV I, vésicules à manteau de clathrine de classe I ; CCV II, vésicules à manteau de clathrine de classe II ; FP, poche flagellaire ; EE, endosome primaire ; RE, endosome de recyclage ; LE ; endosome secondaire ; EXC, vésicule de transport exocytique ; L, lysosome ; ER, réticulum endoplasmique ; G, Golgi ; N, noyau ; PM, membrane plasmique ; F, flagelle (d'après Engstler et al., 2004).
- Figure 7. « Pathogéno-protéomique” : vers une nouvelle approche des interactions hôte-vecteur-pathogène, d'après Holzmüller et al. (2008, sous-pressé).
- Figure 8. Récolte de trypomastigotes sanguicoles sur colonne de DEAE-cellulose
- Figure 9. Schéma d'un cytomètre de flux (<http://wcentre.tours.inra.fr/>).
- Figure 10. Ecran de contrôle lors de l'acquisition des mesures en cytométrie de flux
- Figure 11. Exemple de droite étalon permettant le dosage des protéines des sécrétomes de *T. congolense*.
- Figure 12. Etapes d'analyses d'images de gel 2D-DiGE (Jackie Vogel, CIAN McGill University, Montréal, CAN, <http://biology.mcgill.ca/CIAN/index.htm>)
- Figure 13. Schéma de la réaction biochimique du Western blot (d'après http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p64/TD_blotting.pdf).
- Figure 14. Evolution des indicateurs de pathogénicité et de virulence au cours des infections expérimentales bovines à *T. congolense* IL1180 et IL3000. A : parasitémie ; B : taux d'hématocrite ; C : taux de leucocytes.
- Figure 15. Evolution des indicateurs de pathogénicité et de virulence au cours des infections expérimentales à *T. congolense* IL1180 et IL3000 réalisées sur 3 lots de rongeurs. A : parasitémie ; B : taux d'hématocrite ; C : taux de survie.
- Figure 16. Graphiques et données des contrôles de viabilité et du nombre d'évènements en cytométrie de flux des souches IL1180 et IL3000 après 1h45 de sécrétion. Représentation en

nuage de points des diffusions latérales (SSC-H) et frontales (FSC-H). R1: fenêtre ciblant les trypanosomes (% Gated), par rapport à l'ensemble des évènements (% Total). Représentation en nuage de points de l'émission de fluorescence captée par les détecteurs FL1-H et FL2-H.

- Figure 17. Gel de poly-acrylamide avec les profils peptidiques du standard *T. b. gambiense* (1), des sécrétomes de *T. congolense* IL1180 (2), IL3000 (3 et 4).
- Tableau II. Liste des protéines identifiées en spectrométrie de masse (Q-TOF) sur l'ensemble des sécrétomes de *T. congolense* (IL1180 et IL3000).
- Figure 19. Classification en domaines fonctionnels des protéines identifiées du sécrétome d'IL1180 et d'IL3000 (ProtFun 2.2 Server).
- Figure 20. Classification en catégories selon Gene Ontology des protéines identifiées du sécrétome d'IL1180 et d'IL3000.
- Figure 21. Images des gels 2-D DIGE des sécrétomes de *T. congolense* des souches IL1180 et IL3000.
- Figure 22. Classification en fonction du différentiel d'expression des protéines des sécrétomes des souches de *T. congolense* IL1180 et IL3000.
- Tableau IV. Distribution par classes ou « clusters » des protéines surexprimées dans les protéomes d'IL3000 et d'IL1180.
- Tableau V. Identification des protéines surexprimées dans les gels 2-D DIGE des sécrétomes d'IL1180 et IL3000.
- Figure 23. Protéines identifiées dans les sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000 et reportées sur une image de gel DIGE des sécrétomes.
- Figure 24. Images des gels 2-D DIGE des protéomes de *T. congolense* des souches IL1180 et IL3000.
- Figure 25. Classification des protéines exprimées dans le protéome des souches de *T. congolense* IL1180 et IL3000 en fonction de leur niveau d'expression relatif (Volume / Aire).
- Tableau VI. Répartition par classes des protéines exprimées différemment dans les protéomes d'IL3000 et d'IL1180.
- Tableau VII. Identification des protéines surexprimées dans les gels DIGE des protéomes d'IL1180 et d'IL3000.
- Figure 26. Protéines identifiées dans les protéomes d'IL1180 et d'IL3000 et reportées sur une image de gel DIGE des protéomes.
- Tableau VIII. Groupes de protéines identifiées extraites du sécrétome et du protéome des 2 clones parasites de *T. congolense* et ayant une caractérisation identique.
- Figure 27. Carte de la distribution 2-D par groupe des protéines identifiées et caractérisées, communes au sécrétome et au protéome des 2 clones parasites.
- Figure 28. Cartes de la distribution 2-D des protéines ayant la même identification mais différemment exprimées dans les sécrétomes des 2 clones parasites.
- Figure 29. Immuno-empreintes 1-D de sérums de bovins trypanotolérants (1, 2, 3, 4, 5) et trypanosensibles (6, 7, 8, 9, 10) du sécrétome et du protéome d'IL3000.
- Figure 30. Immuno-empreintes 2-D du protéome d'IL3000 révélées par des sérums de bovins trypanosensibles (TS 716, TS 721) et trypanotolérants (TTND3, TTND5). Les immuno-empreintes les plus importantes sont numérotées de 1 à 7.

AVANT-PROPOS

C'est détenteur d'un Bac B, d'un Brevet Professionnel Agricole et riche d'une expérience agricole de plusieurs années que j'ai été recruté en 1984 à l'Office de Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (ORSTOM, devenu IRD en 1998) en tant que technicien en entomologie médicale. J'ai assumé mes premières fonctions sur le terrain en Afrique, dans le cadre de la lutte contre les glossines vectrices de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil. Dans les années 1990, j'ai renforcé mes connaissances théoriques et mon expérience de laboratoire à Montpellier au sein du Laboratoire des Grandes Endémies Tropicales (LEGET) par l'acquisition de nouvelles compétences en techniques d'analyse biologique (marquage moléculaire, diagnostics sérologique et parasitologique) et en culture cellulaire. C'est cette expérience que j'ai mis à profit à partir de 1993 en transférant ces techniques en Afrique à l'occasion de la création de nouveaux plateaux techniques, le premier à Brazzaville (Congo) et le second à Yaoundé (Cameroun). Depuis mon retour à Montpellier en 2000, je me suis impliqué dans plusieurs travaux de recherche portant sur la transmission de la THA du vecteur à l'homme en réalisant notamment des infections expérimentales du vecteur avec suivi par marqueurs moléculaires, ainsi que des essais de reproduction de la métacyclogénèse *in vitro*. Par ailleurs, je suis aussi chargé de la mise en œuvre des mesures d'hygiène et sécurité (ACMO) de mon unité et gère une cryothèque d'environ 350 souches de trypanosomes conservés dans 2500 stabilats. Après avoir été membre élu au Conseil d'Administration de l'IRD de 2001 à 2007, je participe maintenant au Conseil de mon unité. Je reste toujours en relation avec le terrain au travers d'expertises (RDC, Angola) et d'actions de formation organisées par l'OMS ou les Programmes Nationaux de Lutte. Toutes ces activités sont valorisées par des communications en congrès, la rédaction d'articles et des recommandations au Partenaires du Sud.

Poussé par le besoin d'évoluer dans mon métier de biologiste, je me suis inscrit fin 2003 à l'EPHE afin de renforcer mes connaissances sur un plan théorique et d'obtenir le diplôme de cette école. Le sujet de mon programme de recherche EPHE porte sur l'étude protéomique des facteurs excrétés/secrétés lors des infections à *T. congolense*, parasite d'intérêt en médecine vétérinaire. Il a consisté à mettre en évidence, au moyen des outils de la protéomique, de nouveaux facteurs de virulence et de pathogénicité à des fins diagnostiques et vaccinales. Développés dans le cadre du volet 6 (WP6) du projet européen de Coopération Internationale - Développement (INCO-DEV)

« Development of an anti-disease vaccine and diagnostic tests for African trypanosomosis » (TRYPADVAC2). Les travaux du WP6 ont été réalisés au Laboratoire de Recherche et de Coordination contre les Trypanosomoses (LRCT) de l'UMR177 IRD/CIRAD sous la direction du Dr. Philippe Holzmuller du CIRAD. Mon projet de recherche a été développé en trois ans et a fait l'objet d'une collaboration entre l'UMR 177 IRD/CIRAD, l'UMR 1199 de l'INRA, l'UR121 de l'IRD, la plate-forme protéomique de l'Institut de Génétique Fonctionnelle (IGF, Dr. P. Jouin) à Montpellier, l'Université Simon Bolivar à Caracas (Venezuela, Dr. P. Aso), le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, Dr Z. Bengaly) à Bobo-Dioulasso (Burkina Faso), l'université du KwaZulu-natal à Durban (Afrique du Sud, Dr. A. Boulangé) et enfin le Laboratoire de Parasitologie (EA3677) de l'Université Victor Segalen à Bordeaux (France, Dr. P. Vincendeau).

INTRODUCTION

Les trypanosomoses des mammifères sont des maladies parasitaires à transmission vectorielle dont les agents pathogènes sont des protozoaires flagellés du genre *Trypanosoma*. La transmission à l'hôte définitif est réalisée en général par un insecte hématophage, par piqûre. Cet insecte peut être un simple vecteur mécanique (tabanides, stomoxes, etc...), ou un vecteur biologique, tel que la glossine, chez laquelle le parasite accomplit un cycle avant d'être à nouveau transmis. En Afrique, les trypanosomes sanguicoles sont essentiellement transmis par les mouches tsé-tsé (*Glossina sp.*). La distribution des maladies dont ils sont responsables est donc étroitement liée à celle de leurs vecteurs (à l'exception de *T. vivax*), soit 1/3 du continent africain, compris en le 15° de latitude nord et 20° de latitude sud.

Chez l'homme, on distingue la maladie de Chagas en Amérique du Sud, causée par *T. cruzi* et la Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou maladie du sommeil, qui peut prendre 2 formes, selon le trypanosome impliqué : *T. brucei gambiense* est responsable des infections chroniques d'Afrique Centrale et de l'Ouest, *T. b. rhodesiense* se rencontre en Afrique Australe et de l'Est, et correspond à une forme plus aiguë et plus rapide de l'infection.

Selon le rapport 2006 de l'Organisation Mondiale de la santé (OMS), 45 000 cas ont été diagnostiqués en 1999, mais ce chiffre reste sous-évalué, et l'on estime que le nombre de cas est compris entre 300 000 et 500 000, car le taux de couverture de la surveillance est de seulement 5%. Dans certains villages d'Angola et de la république Démocratique du Congo la prévalence se situe entre 20% et 50% de la population. Dans ces pays, la THA est la deuxième cause de mortalité derrière le SIDA/HIV.

Dans le domaine vétérinaire, les glossines, par les trypanosomes qu'elles transmettent, constituent un facteur limitant de l'élevage en Afrique tropicale humide. Selon le « programme Against African Trypanosomiasis (PAAT), les pertes relatives aux seuls trypanosomoses animales seraient de 1 à 1,34 milliards de dollars US, et pèseraient 4.35 milliards de dollars US dans le produit agricole domestique brut (<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/paat/disease.html>). Elles réduiraient le nombre de tête de bétail de 10 à 50% et la production agricole totale de 2 à 10%. Le coût annuel des trypanocides s'élevait déjà à 30 millions de dollars US en 1998 (FAO, 1998). La

suppression des trypanosomoses animales, devrait permettre d'accroître les productions de viande (16%) et de lait (18%).

Chaque sous-espèce de trypanosome est associée à une pathologie animale particulière : « Surra » (dromadaires) et « Murina » (équins d'Amérique Centrale) pour *T. evansi*, « Fourine » pour *T. equiperdum*, « Nagana » chez les bovins africains pour *T. brucei brucei* ou *T. congolense*. C'est sur cette dernière espèce que porte l'objet de notre étude.

T. congolense a été l'objet de nombreux travaux de recherche depuis les années 1950 et présente des variants génétiques capables de s'exprimer différemment au travers de la pathologie (Godfrey, 1961 ; Garba, 1991 ; Bengaly *et al.*, 2002). C'est cette expression différentielle que nous avons choisie d'étudier par une approche comparative, notamment par la caractérisation des protéines sécrétées/excrétées par le trypanosome, considérées comme étant les premiers éléments d'interaction entre l'hôte et le parasite. Notre démarche a donc consisté dans un premier temps à valider cette expression différentielle par l'étude de la virulence dans deux modèles animaux, le bovin et le rongeur. Dans un deuxième temps, il s'est agi d'établir le différentiel d'expression en s'appuyant sur l'analyse en électrophorèse bidimensionnelle, et pour finir, de caractériser en spectrométrie de masse les protéines d'intérêt impliquées dans la virulence (capacité à se multiplier rapidement dans l'hôte) et la pathogénicité (capacité à induire des signes cliniques).

CHAPITRE I. ETAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le système pathogène

1.1.1 L'agent étiologique

1.1.1.1 Taxonomie

Les trypanosomes forment le genre *Trypanosoma* qui appartient à la famille des *Trypanosomatidés*, règne des protistes (Figure 1). On classe les trypanosomes des mammifères en 2 sections :

- Les Stercoraria, qui sont des trypanosomes à développement postérograde, ce qui signifie une transmission par les déjections contaminantes (*T. theileri* avec les tabanides, *T. cruzi* avec les réduves, etc...)
- Les Salivaria, qui sont des trypanosomes à développement antérograde, c'est-à-dire que la transmission se fait par inoculation ; ce groupe est le plus représenté en Afrique (*T. congolense*, *T. vivax* , *T. b. brucei*, *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. simiae*, *T. suis*, *T. godfreyi*, etc...) .

Les trypanosomes se répartissent entre plusieurs sous-genres (Figure 1), parmi eux *Trypanozoon* (Lühe, 1906), *Duttonella* (Chalmers, 1918) et *Nannomonas* (Hoare, 1964) sont d'intérêt médical ou vétérinaire. Les *Nannomonas* se définissent par leur cycle de développement dans la mouche tsé-tsé, en particulier dans l'intestin moyen et dans le proboscis. Parmi tous les Salivaria, les *Nannomonas* sont les plus petits et présentent certaines particularités morphologiques telles qu'une membrane ondulante proéminente et un flagelle libre (Hoare, 1973). En considération de ces caractères morphologiques, de la spécificité des hôtes et de la pathogénicité, les *Nannomonas* sont classiquement divisés en 2 espèces : *T. congolense* qui possède un spectre d'hôtes mammifères très varié et *T. simiae* que l'on associe généralement aux Suidés.

Le développement des outils moléculaires ces vingt dernières années a permis d'affiner cette classification (tableau I). Une nouvelle espèce a été découverte, *T. godfreyi* ; de plus *T. congolense* se décline désormais en 3 sous-groupes : Savannah, Forest et Kilifi (limité à la côte Ouest du Kenya) ; tandis que *T. simiae* comprend désormais *T. simiae* et *T. simiae* Tsavo (Knowles *et al.*, 1988 ; Mac Namara *et al.* 1994).

Tableau I. Caractérisation des espèces et génotypes du sous-genre *Nannomonas* ; d'après Gibson (2003).

Species	Genotype	Distribution	Host range	Transmission – recorded high prevalence	Growth in rodents	Satellite DNA repeat size (bp)	KDNA minicircle size (bp)	Minixon repeat size (bp)
<i>Trypanosoma congolense</i>	savannah	Tropical Africa	Wide range of ungulates & other mammals	<i>morsitans</i> , <i>palpalis</i> and <i>fusca</i> groups	+	369	850	760 – 1500
	forest	West & Central Africa	Pigs, goats, cattle, dogs, Other?	<i>palpalis</i> group	+	~350	850	~800
	kilifi or Kenya coast	East Africa	Cattle, sheep, goats. Not pigs Other?	<i>morsitans</i> group	+	368	700	~600
<i>Trypanosoma simiae</i>		Tropical Africa	Suids	<i>morsitans</i> , <i>palpalis</i> and <i>fusca</i> groups	-	521	900	630
	tsavo	East Africa	Suids	<i>morsitans</i> and <i>fusca</i> groups	-	~540	-	508
<i>Trypanosoma godfreyi</i>		Tropical Africa	Suids	<i>morsitans</i> and <i>fusca</i> groups	-	373	800, 750	~500

1.1.1.2 Morphologie

Les trypanosomes africains sont des protozoaires fusiformes qui mesurent de 20 à 30 micromètres (μm) de long sur 2 à 3 μm de large (figure 2). Ils sont caractérisés, comme tous les Kinétoplastidae, par la présence d'un organe spécifique, le kinétoplaste, et d'un flagelle.

Le kinétoplaste est une partie spécialisée du compartiment mitochondrial qui contient l'ADN de cet organe ; il est constitué par un réseau dense de mini et maxi cercles d'ADN double-brin (Xu et Ray, 1993 ; Shlomai, 2004). Le flagelle est plus ou moins développé, il constitue la partie antérieure du corps cellulaire, et est composé d'un axonème comprenant 9 paires de microtubules périphériques entourant 2 microtubules centraux (Matthews, 2005). Il naît d'un corps basal situé à l'intérieur de la poche flagellaire et délimite avec le périplasma une membrane ondulante. Le flagelle assure la mobilité du trypanosome et est impliqué dans plusieurs aspects du cycle cellulaire tels que la morphogénèse, la cytokinèse et la migration du corps basal (Kohl et Bastin, 2005)

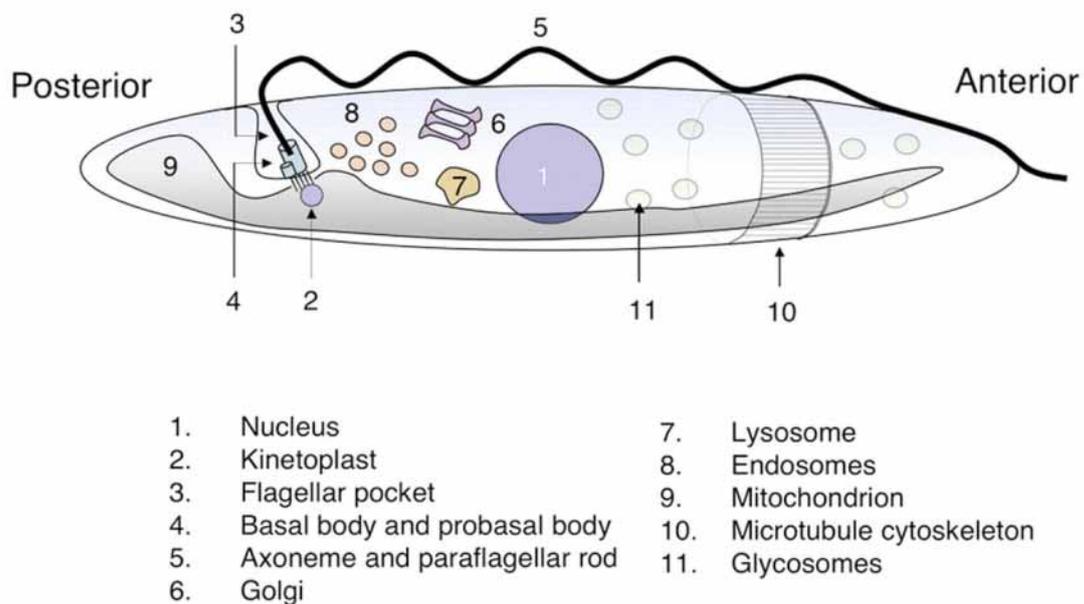


Figure 2. Architecture cellulaire du Trypanosome. Représentation simplifiée de la localisation des principaux éléments de la structure cellulaire, d'après Matthews (2005).

Son niveau de développement permet de distinguer les différents stades morphologiques du parasite au cours de son cycle évolutif (figure 3).

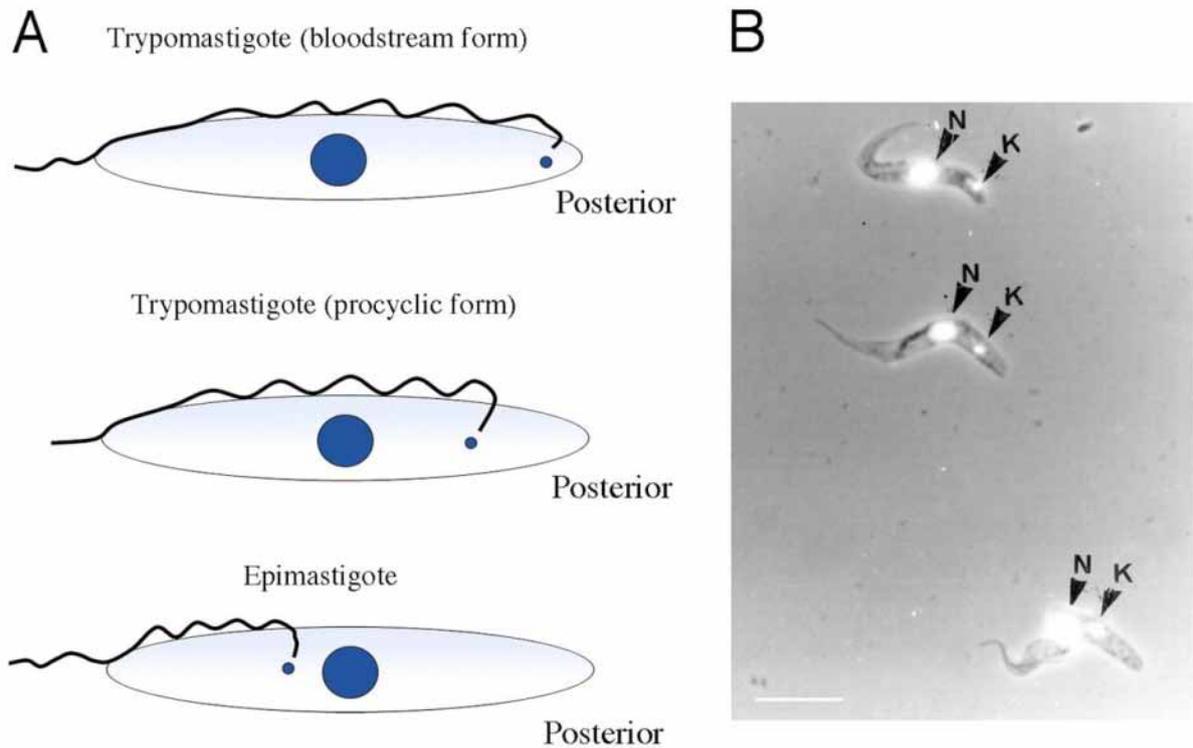


Figure 3. Changement de position du kinétoplaste pendant le cycle cellulaire. (A) position relative du kinétoplaste chez les trypomastigotes sanguicoles, les formes procycliques et épimastigotes par rapport au noyau et à l'extrémité postérieure du trypanosome. (B) Image en contraste de phase de formes sanguicoles en cours de transformation formes procycliques. Position du noyau (N) et du kinétoplaste (K). D'après Matthews (2005). Echelle, 20 μm .

1.1.1.3 Cycle évolutif

Chez les trypanosomes, ce cycle se déroule chez le vecteur ou chez l'hôte. Depuis le repas de sang à la retransmission à un hôte, par voie buccale (*Salivaria*) ou fécale (*Stercoraria*) on observe chez les trypanosomes des transformations morphologiques et métaboliques.

Chez le vecteur

Pendant le cycle évolutif du parasite (figure 4), les trypanosomes se présentent sous la forme procyclique (intestin), épimastigote et métacyclique (glande salivaire).

- **Forme procyclique** : trypomastigote allongé, kinétoplaste situé à mi-chemin entre l'extrémité postérieure et le noyau, et dépourvu de son enveloppe glycoprotéique de surface remplacée par un manteau de procycline.
- **Forme épimastigote** : trypanosomes possédant un flagelle allongé, une membrane ondulante courte, un kinétoplaste et un noyau juxtaposés et se multipliant activement.
- **Forme métacyclique** : trypanosome sous sa forme infectante, possédant un kinétoplaste antérograde (situé derrière le noyau), une enveloppe glycoprotéique de surface et dépourvu de flagelle libre.

D'une durée de 30 jours pour *T. brucei*, il est estimé à environ 18 pour *T. congolense*. Lors de son repas de sang sur un mammifère parasité, la glossine absorbe des formes trypomastigotes. Le sang infecté passe au bout de 10 minutes dans l'intestin moyen de la glossine, puis arrive dans l'espace endopéritrophique. Les trypomastigotes se transforment alors en formes allongées, perdent leur membrane de glycoprotéines et deviennent ainsi non infectieuses (formes procycliques). La multiplication est très active dès les 3^e et 4^e jours pour *T. brucei* et vers le 10^e jour pour *T. congolense*, et les parasites se maintiennent environ 2 mois.

Au plan métabolique, on peut observer une forte activation de l'activité mitochondriale. Les parasites disposent dans l'intestin du vecteur de quantités abondantes de proline et de thréonine qui sont retraités en aspartate, alanine et CO₂ au cours du cycle de Krebs que constitue la chaîne respiratoire (Clayton et Michels, 1996).

Les formes procycliques passent ensuite dans l'espace ectopéritrophique en traversant l'extrémité antérieure de la membrane péritrophique (Evans, 1979 ; Thévenaz, 1981), se transforment en épimastigotes puis gagnent l'œsophage, le pharynx et enfin le canal alimentaire. Les parasites se fixent alors sur les parois du labre grâce à des complexes de jonction (hémidesmosomes et *macula adherens*), réacquièrent leur manteau de surface (VSG) et redeviennent des trypanosomes métacycliques infectants, prêts à être inoculés au prochain repas de sang du vecteur (Ladikpo et Seureau, 1988). Les taux d'infections chez le vecteur sont généralement beaucoup plus élevés avec *T. congolense* qu'avec *T. brucei*, ils peuvent atteindre jusqu'à 30% de la population naturelle de glossines (Morlais *et al.*, 1998).

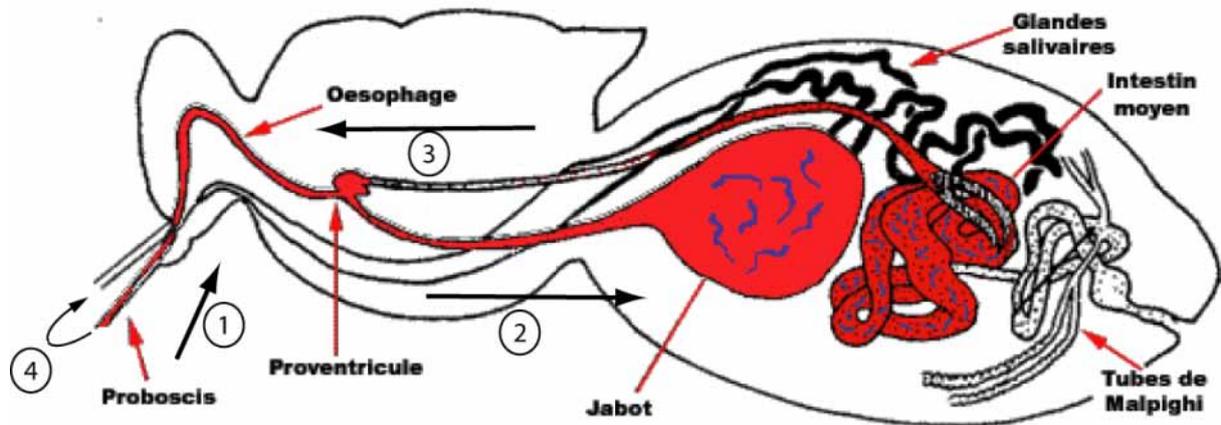


Figure 4. Cycle des *Nannomonas* chez la glossine vectrice (d'après Cuisance, 2000). (1) repas de sang, (2) installation des trypanosomes dans l'intestin moyen et transformation en procyclique après un court passage dans le jabot, (3) migration vers le proboscis en passant par l'espace ectopéritrophique et le proventricule, (4) passage dans l'hypopharynx et transformation en métacyclique.

Chez le mammifère

Les *Nannomonas* appartiennent à la section *Salivaria* : ils sont donc transmis par la salive des vecteurs. Chez l'hôte définitif, les trypanosomes existent sous la forme trypomastigote sanguicole. Chez *T. b. brucei* ils peuvent se présenter sous une forme allongée, trapue ou intermédiaire. Ce sont des trypanosomes possédant un flagelle allongé, une membrane ondulante longue, un kinétoplaste situé en position subterminale et une enveloppe glycoprotéique.

Au cours du repas sanguin les trypanosomes métacycliques sont injectés dans le derme du mammifère avec la salive. Pendant plusieurs jours les parasites vont se multiplier au niveau du point d'inoculation, provoquant parfois une réaction inflammatoire appelée « chancre ». Les trypanosomes envahissent ensuite le système sanguin via le système lymphatique, leur corps s'allonge (forme « grêle »), c'est la phase lymphatico-sanguine. Dans la lymphe, ils envahissent les canaux lymphatiques, les ganglions (hypertrophie), puis tout le système histiomonocytaire. Ils se multiplient ensuite dans le sang et sont prêts à être collectés par une glossine lors d'un nouveau repas de sang.

Les formes grêles (a) ou allongées (type "slender") possèdent un flagelle libre, une membrane ondulante bien développée et un noyau allongé ; ces formes se multiplient activement dans le sang. Les formes intermédiaires ont un flagelle court et une extrémité postérieure plus arrondie. Les formes trapues sont courtes et massives (type "stumpy"), sans flagelle libre, avec un kinétoplaste

plus terminal que dans la forme longue, une extrémité postérieure et un noyau arrondi. Ces formes massives ne se divisent plus chez l'hôte définitif et représentent un stade de "préadaptation" au vecteur.

Au plan métabolique les formes sanguicoles s'adaptent au sang de l'hôte riche en glucose, en inhibant l'activité mitochondriale et en activant le glycosome. Cela se traduit par une forte consommation d'oxygène et une sécrétion importante de pyruvate (Clayton et Michels, 1996).

1.1.2 Pathologie

1.1.2.1 Symptomatologie

L'importance des symptômes observés varie selon les espèces de mammifères, leur « trypanosensibilité », leur alimentation et l'espèce parasitaire impliquée dans l'infection (Murray, 1989). Hyperthermie, anémie, leucopénie, hypocomplémentémie et processus inflammatoires dégénératifs sont les phénomènes physiopathologiques les plus rencontrés. On peut aussi observer chez les animaux infectés, de l'abattement, une certaine pâleur des muqueuses, des avortements, le tarissement de la production de lait, des oedèmes, de la prostration, du pica, du larmoiement, de la splénomégalie, du poil piqué, de l'ataxie ou de la parésie locomotrice, et de la cachexie. Mais aucun de ces symptômes n'est pathognomonique de la maladie.



Figure 5. Bovins trypanosomés (© D. Cuisance)

1.1.2.2 Physiopathologie

- *L'anémie*

C'est le symptôme le plus caractéristique des infections à *T. congolense* (Murray et Dexter, 1988). Elle se traduit par une chute du nombre de globules rouges, du taux d'hémoglobine et de l'hématocrite. En fait l'hémolyse est provoquée par une érythrophagocytose accélérée du fait de l'activation des macrophages dans la rate, le foie ou la moelle osseuse, soit autant d'organes abritant les cellules précurseurs des lignées sanguines. La destruction des trypanosomes provoque la libération de complexes immuns qui se fixent à la surface des hématies, transformant ces derniers en cibles pour les cellules phagocytaires. Cette durée de vie limitée des hématies est compensée par un renouvellement accéléré qui est à l'origine de l'état fébrile. De plus, la sécrétion d'endotoxines par le trypanosome bloque le système hématopoïétique, limitant ainsi la formation des globules rouges. Enfin, le fer issu de la dégradation des hématies est séquestré par les macrophages sous forme d'hémosidérine, et n'est plus disponible pour la synthèse de l'hémoglobine.

- *L'hypocomplémentémie*

Le complément est une cascade biochimique complexe du système immunitaire ; initialement, le rôle des protéines du complément était de compléter l'action des immunoglobulines. Parmi les 35 protéines impliquées dans la cascade, C3 est le facteur pivot. En effet, dès son activation, elle initie l'assemblage du complexe qui attaque la membrane de la cellule à lyser et procède au recrutement des globules blancs. Chez l'animal infecté par *T. congolense* on observe une réduction importante du taux de C3, causée par la mise en œuvre d'un mécanisme d'échappement à la lyse (Nielsen, 1985).

- *Les processus inflammatoires dégénératifs*

La production de catabolites d'acides aminés tels que le tryptophane ou la tyrosine, a un effet toxique et immunodépresseur en favorisant la suppression des réponses prolifératives spécifiques telles que les lymphocytes-T (Lutjje *et al.*, 1995 ; Berger *et al.*, 1996). la production d'enzymes de dégradation (protéases, sialidases, phospholipases, polysaccharides et acides gras) entraîne des lésions vasculaires favorisant l'apparition d'œdèmes (Hambrey *et al.*, 1981).

1.1.2.3 Réponse immunitaire de l'hôte

- *Résistance innée*

L'existence d'espèces bovines (N'dama d'Afrique de l'Ouest) plus résistantes aux infections à *T. congolense* que le Zébu ou les espèces européennes, est la preuve d'une résistance naturelle que l'on

appelle « trypanotolérance ». Elle se manifeste généralement par une parasitémie moins élevée et une anémie moins sévère (Murray et Dexter, 1988).

Trois loci intervenant dans le contrôle de la résistance à *T. congolense* ont été identifiés dans le génome de la souris (Tabel *et al.*, 1999). Le gène de l'interleukine-10 (IL-10) joue un rôle majeur dans l'immunosuppression et semble être un gène d'intérêt pour un des loci (Tyr3b). Par contre, si le complément est toujours activé au cours des infections à *T. congolense*, il n'apparaît pas comme un élément essentiel pour la survie de l'animal infecté. Cela suggère une inhibition de la cascade d'activation du complément par le parasite. Il a d'ailleurs été observé que l'hypocomplémentémie était beaucoup plus marquée chez les zébus infectés que les bovins trypanotolérants (Authié et Pobel, 1990). Les macrophages jouent un rôle central dans la phagocytose. Il a été constaté que les macrophages des N'dama trypanotolérants produisaient beaucoup plus d'oxyde nitrique (NO), cytotoxique, mais moins d'IL-10 que les bovins « Boran », sensibles à l'infection (Taylor *et al.*, 1998).

- Réponse adaptative

Bien que traitées distinctivement, réponses innées et adaptatives sont liées, que ce soit au travers de l'interdépendance entre anticorps et complément (Medzhitov et Janeway, 1998) ou la relation croisée entre antigène/macrophage ou antigène/lymphocytes T (Carroll et Prodeus, 1998).

La production d'anticorps antiVSG constitue la principale réponse immune à l'infection à *T. congolense*, et l'on a observé des taux importants d'immunoglobulines M (IgM) antiVSG chez des animaux infectés (Williams *et al.*, 1996). Pourtant cela n'est pas suffisant pour contrôler la parasitémie. Les immunoglobulines G1 et G2 (IgG1, IgG2) semblent être plus efficaces car elles stimulent la production d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages (Kaushik *et al.*, 1999). Cette production de NO induite par l'interféron- γ (INF- γ) décroît proportionnellement à l'augmentation du taux d'IL-10 (Taylor *et al.*, 1998) et conduit à l'immunosuppression de l'hôte. Inversement, il a été aussi observé que les conditions favorables à l'induction du TNF- γ et de l'IL-12 stimulent le système immunitaire de l'hôte par la production de molécules effectrices de la résistance telles que le NO, l'IgG2 et l'IgG3 (Tabel *et al.*, 1999)

1.1.2.4 Mécanismes d'échappement du parasite

T. congolense étant un parasite extracellulaire qui se limite au domaine vasculaire, il est de ce fait continuellement exposé à la réaction immunitaire de l'hôte ; ce qui se traduit chez lui par la mise en œuvre de mécanismes d'échappement très sophistiqués : facteurs sécrétés ou excrétés ou détournement de facteurs produits par l'hôte.

1.1.2.4.1 Protéines excrétés / sécrétés (PES)

Les PES sont des molécules émises par les parasites en conditions *in vitro* qui miment les produits naturellement diffusés chez l'hôte ; la présence chez le mammifère infecté d'anticorps ciblés contre des PES en constitue la preuve (Schallig *et al.*, 1994, 1996). Ces protéines extracellulaires ont été mises en évidence chez de nombreux protozoaires (De Souza, 2006) et ont suscité l'intérêt de plusieurs équipes de recherche en quête de tests diagnostiques fiables (Li *et al.*, 2007) et de molécules candidates pour des vaccins (Bakker *et al.*, 2004 ; Lemesre *et al.*, 2005, 2007).

Chez les *Trypanosomatidae*, la poche flagellaire constitue l'organe de référence pour l'exocytose et l'endocytose. La poche est recouverte par la membrane du parasite et se situe à l'interface d'un trafic protéique important ; de plus, son renouvellement est fréquent et très rapide, (Overath *et al.*, 1997).

La voie de biosynthèse des PES démarre au niveau des ribosomes cytosoliques ou mitochondriaux et se poursuit dans le réticulum endoplasmique rugueux (RE) où elles sont modifiées et structurées par des chaperonnes (BiP : GRP78 : HSP70 ou CNX / CRT) et des enzymes (PPI et PDI) afin d'être qualifiées pour leur destruction ou leur libération. Une glycosylation est souvent nécessaire pour leur repliement correct et peut intervenir pendant l'acheminement vers le Golgi où va s'effectuer un tri. Ces modifications post-traductionnelles peuvent prendre plusieurs formes différentes : la miristoylation (permet l'ancrage dans les membranes), la méthylation (intervient par exemple sur la calmoduline et le cytochrome c), la sulfatation (s'effectue sur les tyrosines) ou la prénylation (addition de dérivés isoprénoïdes sur la cystéine C-terminale par une liaison thioéther). D'autres protéines sont produites sous forme de précurseurs inactifs dont la protéolyse et l'activation s'effectue sous certaines conditions, il s'agit des proprotéines, préprotéines et préproprotéines. Dans le Golgi, les protéines sont associées à un signal qui permet de les acheminer vers le lysosome ou vers les vésicules exocytaires. Ces dernières se fixent à la surface interne de la poche flagellaire en la pinçant et libèrent ainsi leur contenu protéique dans la lumière de la poche.

Les VSGs restent fixées à la membrane et se déplacent avec elle jusqu'à la surface extérieure du parasite dans un mouvement latéral.

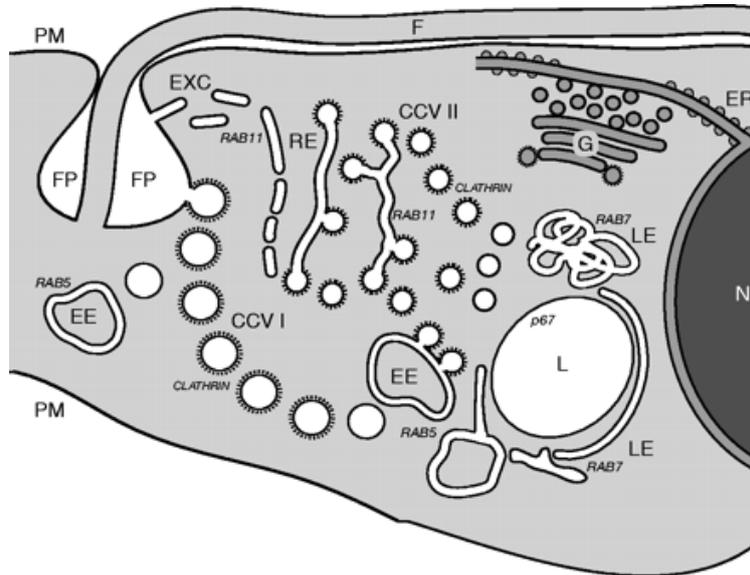


Figure 6. Vue schématique de la partie postérieure d'un trypomastigote sanguicole de *T. brucei* sl. CCV I, vésicules à manteau de clathrine de classe I ; CCV II, vésicules à manteau de clathrin de classe II ; FP, poche flagellaire ; EE, endosome primaire ; RE, endosome de recyclage ; LE ; endosome secondaire ; EXC, vésicule de transport exocytique ; L, lysosome ; ER, réticulum endoplasmique ; G, Golgi ; N, noyau ; PM, membrane plasmique ; F, flagelle (d'après Engstler *et al.*, 2004).

1.1.2.4.2 Autres mécanismes d'échappement

La variation antigénique, par le renouvellement régulier des glycoprotéines variables de surface (VSG), constitue le principal mécanisme d'échappement et d'adaptation du trypanosome à la réponse immunitaire (Borst, 1991 ; Borst *et al.* 1997 ; Cross ,1998 ; Pays, 2006). Il lui permet de focaliser les défenses de l'hôte, tout en se maintenant à bas-bruit en fabriquant de nouvelles VSGs. Pour échapper à la lyse par le complément, il a été observé que *T. congolense* est capable d'émettre des filaments à sa surface (Shakibaei et Frévert, 1992) et de larguer des complexes immuns (Frévert et Reinwald, 1990) capables de s'associer à un composant du complément, le C3b (Liu *et al.*, 1993), ce qui a pour conséquence de détourner du parasite l'activité des macrophages et des lymphocytes B. De même, au cours de la dysérythropoïse les complexes immuns fragilisent les globules rouges par altération physico-chimique de leur surface, ce qui fournit un signal d'élimination aux phagocytes, détournés ainsi de la cible parasitaire (Authié *et al.*, 1993). L'hôte produit aussi plusieurs facteurs que le trypanosome détourne à son profit tels que les cytokines, les prostaglandines, le TNF- α et l'INF- γ

qui interviennent dans le syndrome fébrile et la fonte musculaire, l'inflammation et l'immunosuppression. Cette dernière est la conséquence de l'inhibition de la production du NO chez les macrophages et s'accompagne par l'induction de l'activité arginase, qui synthétise la L-ornithine, précurseur des polyamines, elles-mêmes impliquées dans la synthèse de l'ADN et du trypanothione, éléments fondamentaux du métabolisme du trypanosome (Vincendeau et Daulouède, 1991 ; Vincendeau et Bouteille, 2006).

1.1.2.4.3 Les cystéines protéases (CPs)

Les cystéines protéases sont des enzymes capables de cliver ou hydrolyser une liaison peptidique, leur rôle principal est la dégradation des protéines. Ces enzymes présentent toutes une même caractéristique : elles possèdent au sein de leur cycle catalytique une cystéine avec un groupement thiol. Les CPs de *Trypanosomatidae* telles que la congopaine (Authié *et al.*, 1992 ; Mbawa *et al.*, 1992) et la cruzipaine (Cazzulo *et al.*, 1989 ; Murta *et al.*, 1990 ; North *et al.*, 1990) ne sont pas uniquement indispensables à la survie des trypanosomes tout au long de leur cycle, mais semblent aussi jouer un rôle important dans la virulence et la pathogénicité (Mottram *et al.*, 1998).

1.2 Justifications du modèle de l'étude

La première hypothèse de travail est que les PES sont des éléments fondamentaux de la pathogénèse des infections à *T. congolense*, et plus précisément dans les interrelations hôte-parasite au niveau cellulaire. L'analyse de ces interactions doit mettre en exergue ce dialogue entre le niveau constitutif de la cellule et son expression pour mieux en comprendre la fonctionnalité, même s'il est clair que les PES ne sont qu'une partie des facteurs impliqués dans ces interactions complexes. La seconde hypothèse tient dans le fait que la variabilité des PES pourrait être reliée à la diversité des signes cliniques induits ou encore plus simplement à une diversité géographique ; à ce titre les PES pourraient d'ailleurs être de bons candidats pour des tests diagnostics.

1.2.1 Choix de la trypanosomose à *T. congolense*

Afin de tester ces hypothèses nous avons choisi d'adopter une approche comparative à partir de deux clones de *T. congolense* du type « Savanne » IL3000 et IL1180, déjà largement étudiés

(Nantulya *et al.*, 1984 ; Pinder *et al.*, 1987 ; Pinder *et al.*, 1988 ; Katunguka-Rwakishaya *et al.*, 1997) et connus respectivement pour leur forte et faible virulence / pathogénicité chez le bovin (Paling *et al.*, 1987 ; Authié *et al.*, 1993 ; Andrianarivo *et al.*, 1995 ; Witola et Lovelace, 2001). La difficulté à disposer d'un modèle expérimental bovin (contraintes règlementaires, coût) nous a poussé à transférer le modèle chez les rongeurs, avec lesquels de nombreuses expériences ont déjà été réalisées, dont certaines utilisaient déjà les mêmes clones parasites que ceux que nous avons choisis pour cette étude (Bengaly *et al.*, 2002 ; Naessens *et al.*, 2004).

L'originalité de notre démarche va donc s'appuyer sur la standardisation des échantillons biologiques testés ; en effet, chez les trypanosomes, la variabilité de la réponse de l'hôte, mais aussi la capacité infectieuse du parasite peuvent moduler le tableau clinique. Il sera donc indispensable de répéter un certain nombre de fois les expérimentations *in vivo* pour valider la solidité du modèle expérimental.

1.2.2 Pourquoi la protéomique ?

Les relations entre les pathogènes, leurs hôtes et leurs vecteurs s'établissent sur la base d'un échange bien établi au niveau moléculaire. Variabilité et régulation de ces interactions partent du génome pour s'exprimer au travers de la transcription de l'ARN (initiation, chevauchement, maturation, édition...) et permettre la production de protéines fonctionnelles, facteurs d'initiation, d'assemblage, de modifications post-traductionnelle, de signalisation et d'adressage. L'analyse des interactions entre les trois acteurs du complexe pathogène met en exergue des croisements entre les parties constitutives et expressives, ayant des implications dans le domaine fonctionnel. Quel que soit le domaine analysé (génomique, transcriptome, protéome: ensemble du contenu cellulaire, et sécrétome: molécules naturellement excrétés-sécrétées) ceux-ci interagissent à l'intérieur des acteurs du complexe.

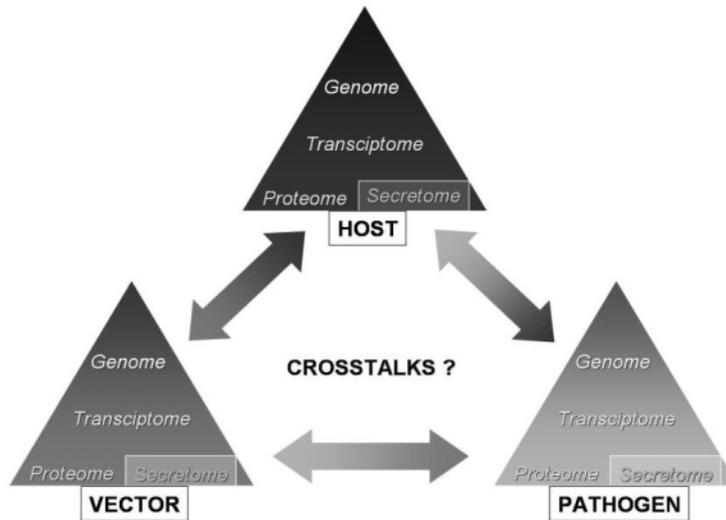


Figure 7. « Pathogéno-protéomique” : vers une nouvelle approche des interactions hôte-vecteur-pathogène, d’après Holzmuller *et al.* (2008, sous-presse).

L’électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) est notre méthode d’analyse de référence. Elle permet de dresser une cartographie fidèle des protéines exprimées par la cellule en reflétant tous les changements d’expression, isoformes ou modifications post-traductionnelles (phosphorylation, glycosylation ou protéolyse) intervenant dans le RE et au cours du transfert vers le Golgi, et qui correspondent à un état déterminé. La capacité de la 2-DE à étudier de façon différentielle l’expression des protéines en fait l’outil de choix pour réaliser une étude protéomique de nos deux clones parasites. De plus, la répartition des molécules en fonction de leur point isoélectrique et de leur masse moléculaire permet de les prélever facilement pour identification en spectrométrie de masse (MS). Sa grande capacité qui peut permettre de révéler simultanément jusqu’à 5000 protéines, est alliée à une forte sensibilité (<1ng de protéine par spot). L’utilisation de marqueurs fluorescents permet la réalisation de gels d’électrophorèse bidimensionnelle différentielle ou DIGE. Cette technique offre la possibilité de réaliser des expériences en multiplex où les échantillons marqués sont mélangés puis séparés sur le même gel. La variation inter-gel est ainsi complètement éliminée et le nombre de gels requis par expérience s’en trouve réduit d’un facteur deux à trois. La DIGE permet aussi une comparaison inter-gels quand l’un des trois échantillons est un mélange de tous les échantillons expérimentaux en quantités égales (un mélange de contrôles internes). Ceci crée un standard pour chaque protéine présente dans les gels. Par conséquent, des comparaisons entre gels peuvent être effectuées avec fiabilité. Enfin, La DIGE est de manipulation aisée car du fait que les protéines soient pré-marquées, les gels DIGE n’ont pas à être manipulés après

électrophorèse. De plus, le scanner utilisé pour la formation des images accepte le montage complet du gel et des plaques. Ceci réduit la variation inter-gels et le risque d'endommager ou de détruire les gels.

La spectrométrie de masse nous permet d'identifier les protéines constitutives ou sécrétées, exprimées de façon différentielle par chacune des souches parasitaires et sélectionnées par l'analyse des gels d'électrophorèse 2-D. Dans cette étude, deux techniques différentes ont été utilisées pour l'identification des protéines : la MS/MS (Plate-forme UMR 1199 INRA, Montpellier) et le MALDI-TOF (Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier). La spectrométrie de masse en tandem (Q-TOF MS/MS) consiste à sélectionner et fragmenter un ion par une première spectrométrie de masse pour séparer les peptides, puis à les séquencer acide aminé par acide aminé. Elle présente l'avantage d'une ionisation très douce, d'une grande sensibilité, mais elle est limitée au séquençage de fragments inférieurs à 2 kDa.

Les protéines prélevées dans les gels d'électrophorèse bidimensionnelle ont aussi été traités en MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) - TOF (Time Of Flight). Dans ce type d'analyse spectrométrique l'échantillon est co-cristallisé avec une matrice qui va absorber l'énergie d'un tir laser et la restituer en partie à l'échantillon qui sera désorbé en phase gazeuse, le temps de vol étant proportionnel à la masse des ions. Au cours de l'analyse en MALDI -TOF, les ions restent mono chargés, il n'y a pas de fragmentation, mais la technique est plus tolérante vis-à-vis des sels et reste d'une bonne sensibilité (femto 10^{-15} à attomole 10^{-18}) sur une gamme étendue (>10 000 kDa).

Si le choix de la spectrométrie de masse en tandem nous permet de réaliser une identification exhaustive de l'ensemble des protéines présentes dans le sécrétome, l'analyse en MALDI-TOF porte sur une sélection de protéines exprimées en électrophorèse bidimensionnelle, ce qui présente l'avantage de mieux cibler les protéines d'intérêt.

CHAPITRE II. MATERIEL ET METHODES

2.1 Matériel Biologique

L'ensemble des infections expérimentales et de la production parasitaire a été réalisé *in vivo* sur bovins et sur rongeurs. Toute cette partie des expérimentations a suivi les contraintes imposées par la directive 86/609 du Conseil des Communautés Européennes du 24 novembre 1986. Cette directive concerne le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des états membres, relatives à la protection des animaux utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques. Les animaux ont été suivis dans des animaleries mises en conformité, répondant à certaines normes (niveau de sécurité n°2 pour les infections parasitaires) et disposant d'un agrément pour l'expérimentation animale (arrêté n°03XIX25 du 10 avril 2003, agrément B34-172-20). Ils ont été manipulés par des personnels formés et disposant d'une autorisation d'expérimentation. Chaque expérimentation a fait l'objet d'une demande d'autorisation auprès du comité d'éthique régional.

2.1.1 Infections expérimentales bovines

Dans le cadre du WorkPackage 6 du projet européen de Coopération Internationale - Développement (INCO-DEV) « Development of an anti-disease vaccine and diagnostic tests for African trypanosomosis » (TRYPADVAC2), les infections expérimentales sur bovins ont été conduites au CIRDES à Bobo-Dioulasso (Burkina-Faso) entre 2003 et 2006. Cinq groupes de 9 génisses âgées de 18 à 24 mois, en provenance des zones sahéliennes du nord du Burkina-Faso, indemnes de trypanosomoses animales, ont été utilisés dans le protocole expérimental. Les injections ont été réalisées par voie sous-cutanée avec 10ml de sang de souris infectée contenant 10^5 trypanosomes / ml. Quatre souches parasitaires ont été inoculées, dont IL3000 et IL1180.

Les observations cliniques sur les bovins ont été quotidiennes et trois fois par semaine plusieurs paramètres biologiques ont été analysés à partir de prélèvements sanguins : taux d'hématocrite (Packed Cell Volume ou PCV), suivi de la cinétique parasitaire (parasitémie), évaluation du taux de leucocytes et mesure du poids vif de l'animal.

La numération de la formule sanguine (NFS) est utile pour déterminer l'importance de l'anémie. Le taux d'hématocrite donne la concentration en hémoglobine dans le sang, qui est abaissée en cas d'anémies. On l'obtient après centrifugation du tube capillaire à hématocrite (contenant du sang de la veine auriculaire ou jugulaire) et sa lecture dans un lecteur à hématocrite. La hauteur de la colonne des globules rouges est exprimée comme un pourcentage du volume total de sang. Même si le PCV peut être influencé par l'âge et le niveau de susceptibilité génétique du bétail, et avoir une autre origine que la trypanosomose, il reste néanmoins l'un des indicateurs les plus importants des trypanosomoses du bétail (Murray *et al.*, 1977). Le taux de leucocytes est le premier paramètre qui traduit la réponse immunitaire de l'hôte en cas d'infection.

La centrifugation en tube à hématocrite et la technique du « Buffy Coat » permettent à la fois la mesure du taux d'hématocrite et le diagnostic parasitologique. La technique du « Buffy Coat » consiste à séparer par centrifugation le plasma des globules rouges. Entre les deux se trouve une mince couche blanchâtre, représentant environ 1% du sang prélevé, qui contient une grande partie des globules blancs et des plaquettes ; c'est aussi là que sont concentrés les trypanosomes.

2.1.2 Production parasitaire

2.1.2.1 Souches parasitaires

Deux clones de *Trypanosoma congolense* du type « Savane » ont été utilisés pour l'étude : IL3000 et IL1180. Ces 2 souches parasitaires présentent l'intérêt d'avoir un génome en cours de séquençage ; elles nous ont été fournies par le Centre International de Recherche - Développement sur l'Élevage en zone Sub-humide (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina-Faso).

- IL3000 a été isolée sur bovin à Transmara (Kenya) en 1983 et est considérée comme étant une souche très pathogène pour les caprins (Fish *et al.*, 1989).
- IL1180 (ou SERENGETI/71/STIB212) a été isolée sur un lion (*Panthera leo*) de la réserve du Serengeti (Tanzanie) en 1971 (Geigy et Kaufman, 1973).

2.1.2.2 Production de trypanosomes *in vivo*

La production de parasites a été réalisée sur rats immunodéficients homozygote NUDE / SOPF (Specific & Opportunistic Pathogen Free) de 4 semaines, en provenance des laboratoires CHARLES RIVER. Un protocole de production est déposé 3 semaines avant l'inoculation et validé par le responsable vétérinaire du CIRAD et le correspondant Hygiène et Sécurité afin de vérifier que les protocoles de manipulations sur les rongeurs sont conformes à la réglementation sur les manipulations d'animaux de laboratoire. Le risque encouru avec l'utilisation des rats NUDE est la facilité que ces rongeurs ont à acquérir des infections bactériennes et à développer une septicémie, qui à terme peut être fatale. Pour cette raison, les rats NUDE ont été isolés et leurs cages protégées par des filtres.

Après décongélation rapide, 250 µl de solution parasitaire comprenant environ 10^7 trypanosomes / ml (soit un inoculum contenant $2,5 \times 10^6$ parasites), ont été injectés au rongeur par voie intra péritonéale (I.P.). Un suivi parasitologique a été effectué tous les 2 jours par prélèvement d'une goutte de sang au bout de la queue. L'examen a été réalisé au microscope avec l'objectif 40X, entre lame et lamelle. La parasitémie est évaluée par la méthode rapide d'estimation (« Rapid matching method ») d'Herbert et Lumsden (1976).

Pour la réalisation des sécrétions à partir de la densité inoculée et en fonction de la souche parasitaire utilisée, il a fallu compter entre 5 et 15 jours avant que la parasitémie du rat atteigne environ $2,5 \times 10^8$ parasites /ml (Antilog 8,4).

La diéthylaminoéthylcellulose (DEAE) et les tampons ont été préparés suivant les protocoles décrits par Lanham et Godfrey (1970) (voir Annexe 1). Le tampon mère utilisé pour les lavages de la cellulose est un tampon phosphate salin 0,2 M à pH 8. Après lavage, la DEAE est stérilisée par autoclavage à 120°C / 30 minutes. Pour la récolte, le montage de la colonne de DEAE est réalisé sous hotte à flux laminaire (figure 8) : la cellulose est versée délicatement dans une seringue de 50 ml stérile, bouchée et contenant une double épaisseur de papier Whatman n°1 stérilisé par exposition aux ultra-violets, puis la colonne est équilibrée en tampon phosphate à 2% de glucose (PSG).

Lorsque le pic parasitémique est atteint (antilog 8,4 - 8,7, soit $\times 2,5 \cdot 10^8$ - $5 \cdot 10^8$ trypanosomes / ml de sang), le rongeur est anesthésié par inoculation en I.P. d'une solution de kétamine (IMALGENE[®], 150mg/kg de poids vif). Précisons que la kétamine est considérée comme un stupéfiant, et que son utilisation dans notre laboratoire est l'objet d'une procédure. Le sang est ensuite prélevé par voie intracardiaque (I.C.) après injection de 100 µl d'anticoagulant (Héparine CHOAYTM). Un rat pesant

entre 200 et 250 grammes donne environ 8 ml de sang. Le sang est mélangé avec un tampon de lyse hématocytaire (voir Annexe 1) et mis à incuber pendant 10 minutes à 4°C. La solution est ensuite centrifugée (1500g / 10 minutes / 4°C). Après élimination du surnageant, le culot est resuspendu dans 5 ml de tampon PSG puis transféré sur la colonne de DEAE cellulose. L'élution s'effectue au goutte-à-goutte et la récolte se poursuit jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de parasites à la sortie de la colonne.



Figure 8. Récolte de trypomastigotes sanguicoles sur colonne de DEAE-cellulose.

2.1.3 Sécrétions

2.1.3.1 Incubation

Après récolte, les parasites sont lavés par agitation douce dans des tubes contenant 50 ml de tampon PSG, puis centrifugés à 1500g / 10 minutes / +20°C. Le surnageant est éliminé et le culot resuspendu doucement dans 2 ml de PSG. Le lavage est répété 3 fois. Lors du dernier lavage, le PSG est remplacé par le tampon de sécrétion (Holzmuller *et al.* 2008). Après les lavages, un comptage est réalisé sur la cellule de Thomas et les parasites sont incubés dans du tampon de sécrétion (2×10^8 P / ml). Cette quantité a été définie lors de sécrétions réalisées avec *T. b. gambiense* (Holzmuller *et al.* 2008). L'incubation se déroule pendant 2 heures / 37°C / 5% CO₂.

2.1.3.2 Suivi et viabilité des parasites en sécrétion

Un suivi en cytométrie de flux a été réalisé au bout d'une heure, puis toutes les 15 minutes, jusqu'à 2 heures de sécrétion, afin de suivre l'évolution de la mortalité et mettre fin à la sécrétion à proximité du seuil de +/- 3% de mortalité. Dix microlitres de chaque lot de sécrétome ont été dilués dans 1 ml de PBS à 5ug/ml final d'iodure de propidium. L'iodure de propidium est un fluorochrome

qui s'intercale sur l'ADN décondensé des cellules mortes. Son pic d'émission se situe à 620 nm. L'acquisition est paramétrée pour durer 52 secondes au maximum, ou le temps de compter 300 000 cellules.

Le FACSort (BECTON DICKINSON™) comprend :

a) une unité humide incluant la source laser, les fluides et les détecteurs.

b) un logiciel (CELL Quest®) qui permet une analyse rapide et très sensible de la cytométrie.

Les cellules en suspension dans la solution contenant l'iodure de propidium sont acheminées dans la chambre d'écoulement où elles sont alignées dans une buse et intégrée dans un flux par focalisation hydrodynamique (figure 9).

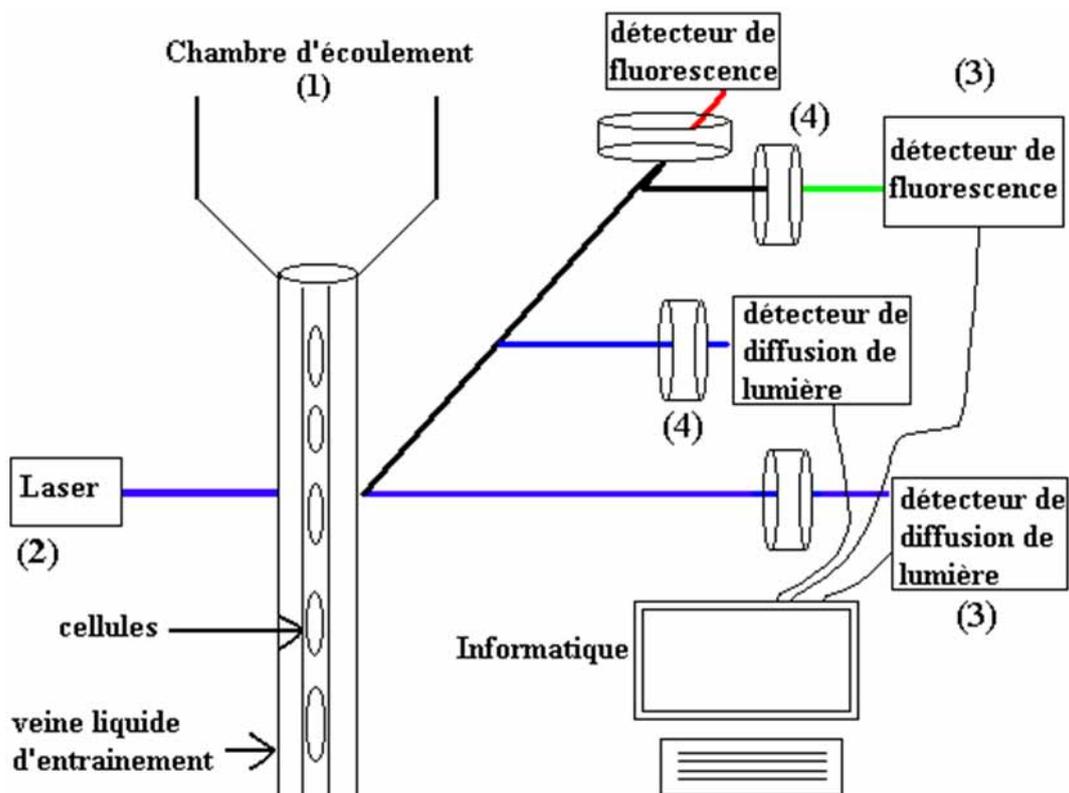


Figure 9. Schéma d'un cytomètre de flux (<http://wcentre.tours.inra.fr/>).

Elles défilent ensuite à grande vitesse dans le faisceau d'un laser. Le reflet lumineux émis par chaque cellule est amplifié par les tubes photomultiplicateurs (PMT). L'enregistrement de ces paramètres permet d'évaluer d'une part la diffusion des particules lumineuses, d'autre part la

fluorescence émise par chacune des cellules analysées. La mesure de la diffusion est réalisée selon deux modalités : la « Forward Scatter orientation » (FSC) ou diffusion frontale de la lumière, et la « Side Scatter orientation » (SSC) ou diffusion latérale de la lumière. Ces deux dimensions permettent de mesurer respectivement la taille et la granulosité de la cellule analysée. La mesure de la fluorescence passe par des filtres (FL1, FL2, FL3) correspondant à différentes longueurs d'ondes du spectre. Les signaux lumineux sont ensuite transformés en signaux analogiques, puis en signaux numériques avant d'être traités sous formes d'histogrammes (figure 10).



Figure 10. Ecran de contrôle lors de l'acquisition des mesures en cytométrie de flux

2.1.3.3 Récolte et stockage

Après 2 heures d'incubation (dans le tampon de sécrétion), la solution parasitaire est centrifugée (1500g / 15 minutes / +4°C) puis le surnageant est filtré à 0.22 µm avec un filtre à faible adsorption de protéines. Après ajout d'un cocktail d'antiprotéases (Complete, ROCHE™) les sécrétomes et les culots parasitaires sont aliquotés puis stockés à -80°C.

2.1.3.4 Dosage des protéines

La concentration de protéines dans les sécrétomes a été obtenue en appliquant la technique de dosage colorimétrique de Bradford (1976) à l'aide d'un kit Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules™, CA, USA). Le principe de cette méthode repose sur l'addition d'un réactif coloré aux solutions protéiques à doser. La réalisation d'une gamme étalon avec une solution de concentration connue d'une protéine de référence, en l'occurrence l'albumine sérique de bovin, permet de mesurer l'absorbance des solutions contenues dans chaque tube. Les valeurs obtenues sont utilisées pour tracer une droite de

régression linéaire ($R^2 > 0,950$) dont la formule permettra de déduire la concentration de la protéine à doser (figure 11). La longueur d'onde classiquement utilisée est de 595 nm. La sensibilité de la technique est élevée puisque le seuil peut atteindre $0,11\mu\text{g}$ par μl

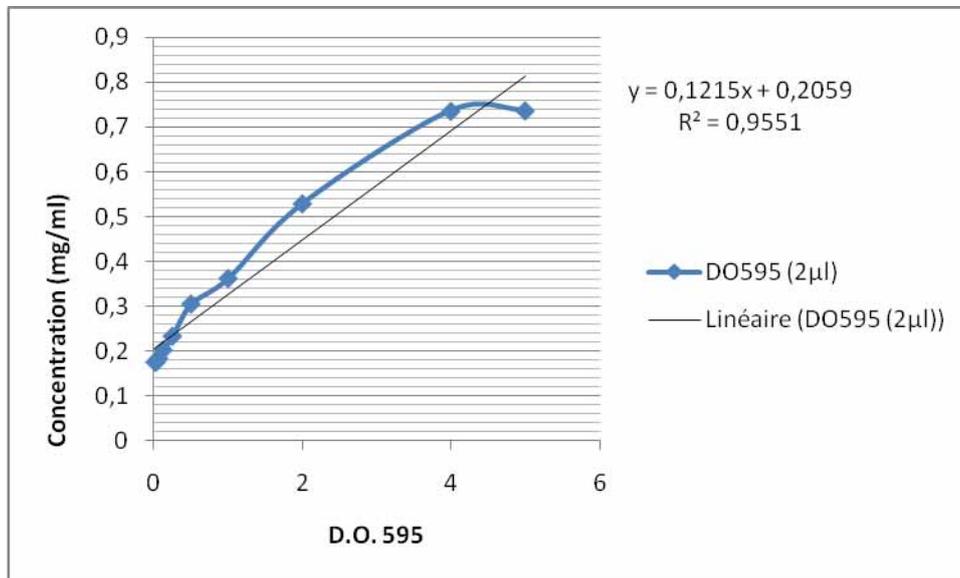


Figure 11. Exemple de droite étalon permettant le dosage des protéines des sécrétomes de *T. congolense*.

2.2 Analyse protéomique

2.2.1 Caractérisation systématique des ES

2.2.1.1 Extraction des protéines

Les protéines des sécrétomes ont été extraites par précipitation à l'acide trichloroacétique ou TCA selon le protocole de Chevallet *et al.* (2007). Au cours de cette précipitation, les échantillons sont traités avec un détergent tensioactif, le lauroylsarcosinate de sodium (NLS) à 0,1%, puis les protéines sont extraites avec du TCA à 7,5% final et lavées au tétrahydrofuran (THF). Cette méthode (Annexe 2) est particulièrement adaptée aux très faibles concentrations protéiques comme celles rencontrées dans le sécrétome.

2.2.1.2 Electrophorèses

Lors d'une électrophorèse en gel SDS-Polyacrylamide (SDS-PAGE ; Laemmli, 1970), les protéines migrent sous forme dénaturée et réduite dans le gel de polyacrylamide en fonction de leur masse moléculaire. La présence d'un détergent, le Sodium dodécyl sulfate (SDS) les charge négativement et permet leur migration vers la cathode en fonction uniquement de la longueur de la chaîne polypeptidique. Dans notre étude nous avons réalisé 2 types d'électrophorèses 1-D :

Electrophorèse de contrôle (voir Annexe 2) :

Afin de vérifier la qualité de nos extraits protéiques, une électrophorèse en gel 1-D SDS-PAGE à 10% d'acrylamide-bisacrylamide a été réalisée, cette concentration permettant d'avoir une gamme de migration de 22 à 250 kDa. Pour un gel, l'ampérage est constant (25 mA), mais il peut être augmenté jusqu'à 45 mA une fois que le front de migration est au delà du gel de concentration ou « stacking gel ». L'électrophorèse a été suivie d'une fixation en méthanol / acide acétique et d'une coloration au nitrate d'argent.

Electrophorèse 1-D pour analyse en spectrométrie de masse (voir Annexe 2) :

Pour l'analyse des échantillons en MS/MS, une électrophorèse 1-D a été réalisée en gel SDS-PAGE à 15% d'acrylamide-bisacrylamide, cette concentration offrant une gamme de séparation allant de 2,5 à 150 kDa, elle privilégie la migration des protéines de faible masse moléculaire. Les protéines ont été dénaturées dans du tampon de Laemmli (3-4 minutes / 95°C) avant d'être déposées dans les puits du gel (100 µg / dépôt). La migration peut se faire toute la nuit à ampérage constant à 7mA ou à

30-35 mA pendant 5h. Les protéines sont fixées par un bain d'éthanol et d'acide acétique, puis lavées et incubées sur agitateur pendant 4 jours avec une solution de coloration au Bleu de Coomassie colloïdal G250. Le gel est ensuite lavé 4 fois à l'eau milliQ pour éliminer le piégeage aspécifique du bleu colloïdal dans les mailles.

Electrophorèse bidimensionnelle (2-DE) (Annexe 2)

- Focalisation isoélectrique ou IEF : Les bandelettes « Immobilines DryStrips » (Amersham Biosciences™) de pH 3-10 non linéaire, ont été réhydratées toute la nuit (Annexe 2) avec l'extrait protéique non dénaturé. Les strips sont ensuite placés sur le plateau du Multiphor et mis à migrer selon les paramètres électriques suivants : 100V pendant une 1h, puis 300V pendant 3h, puis 1000V pendant 1h, puis 3400V/60-70 kWh.
- Equilibrage des strips : étape indispensable avant l'électrophorèse en 2ème dimension, l'équilibrage comprend 2 incubations successives dans 2 tampons d'équilibrage (Annexe 2). Le tampon d'équilibrage contient : du Tris HCl (75mM, pH 8.8) qui permet de maintenir le pH du strip pendant l'électrophorèse ; de l'urée (6M) qui, associée au glycérol (30%), permet d'éviter les effets électro-endosmotiques ; du dithiothreitol (DTT) qui réduit les ponts-disulfure ; du sodium dodecyl sulfate (SDS) qui dénature les protéines et favorise la formation de complexes chargés négativement ; et enfin de l'iodoacétamide (tampon II) qui empêche la reformation des ponts-disulfure.
- Migration 2-DE en gel SDS-PAGE vertical : On coule le ou les gels (12% acy-bisacry) avec le volume de solution d'acrylamide-bisacrylamide correspondant à l'appareil utilisé (Ettandalt) et on laisse polymériser toute la nuit. Le strip est ensuite transféré au sommet du gel SDS et scellé avec une solution de 1% d'agarose. Après avoir placé les cassettes de gel dans la cuve, l'électrophorèse est lancée à 17°C, à raison de 15mA / gel / O.N. Après fixation à l'éthanol et à l'acide acétique, la coloration a été réalisée au Bleu de Coomassie colloïdal.

2.2.1.3 Digestion des protéines et extraction des peptides

Chaque bande a été ensuite découpée par un robot et mise à digérer en tampon de digestion des protéines contenant du Dithiothréitol (DTT) et de l'iodoacétamide (Annexe 2). Le DTT et l'iodoacétamide sont des agents réducteurs dont le rôle consiste réduire la formation de ponts-disulfure entre les résidus cystéines des protéines. Après 2 cycles de déshydratation/réhydratation les échantillons sont déshydratés par dessiccation et mis à digérer par de la trypsine dans une

solution d'hydrogénocarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃). La trypsine est une protéase spécifique qui catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des lysines et des arginines. Après digestion, les peptides sont récupérés dans le surnageant puis mis en réduction/alkylation en acétonitrile, bicarbonate d'ammonium, acide formique et sont lyophilisés. L'étape finale avant l'analyse au spectromètre de masse consiste à effectuer un dessalage et une pré-concentration des échantillons par chromatographie en phase inverse (Zip-Tip micro C18 MILLIPORE[®]). Les échantillons repris dans une solution à 1% d'acide formique ont été directement déposés sur la cible en inox en quantité égale avec la matrice (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid).

2.2.1.4 Identification des protéines en spectrométrie de masse

- *Echantillons 1-D* : les peptides issus de la trypsinolyse (1 μ l) ont été analysés en ligne en Q-TOF (Quadripole – Time Of Flight) en utilisant une HPLC nano débit (HPLC Capillaire LC Packings, 2003) couplée à un spectromètre de masse (QSTAR Pulsar-i, Applied Biosystems[™]). Les peptides ont été fragmentés à partir de l'extrémité C-terminale, acides aminé par acide aminé (séquençage). Après nébulisation, désolvatation et ionisation, les ions peuvent être détectés et triés selon leur rapport masse sur charge (m/z).
- Les séquences peptidiques obtenues ont été comparées aux séquences protéiques existant dans la base de données SwissProt/TrEMBL pour *T. brucei*.
- *Echantillons 2-D* : les peptides ont été analysés en MALDI-TOF (Ultraflex TOF/TOF, BRUKER DALTRONICS[™]) et le spectre de masse a été acquis en mode *réflectron* (*mode positif*). La matrice qui enrobe l'échantillon sert à absorber l'énergie d'un tir LASER et à la restituer en partie à l'échantillon qui sera désorbé en phase gazeuse. Après accélération dans un champ électrique intense, les ions mono-chargés dérivent le long d'un tube et vont frapper un détecteur. Le temps de vol (TOF) est proportionnel à la masse des ions et à leur charge, d'où l'unité de mesure m/z. Une calibration interne fut obtenue et réalisée grâce aux masses des peptides de la trypsine. Les données spectrales ont été analysées avec le logiciel Mascot © (MATRIX SCIENCE[™]). Les masses peptidiques obtenues ont été comparés aux masses peptidiques théoriques *in silico* proposées par la base de données SwissProt/TrEMBL pour les taxons « *TRYPANOSOMA* » et « *RATTUS* ». Les critères d'identification ont été établis sur la base d'un score et d'un pourcentage de

recouvrement des séquences peptidiques de référence. Les échantillons non identifiés en MALDI-TOF ont été retraités en Q-TOF.

2.2.2 Approche comparative des sécrétomes et des protéomes

La cartographie différentielle en gels 2D, va nous permettre de comparer les différentiels d'expression des 2 souches parasites entre leurs protéines solubles du sécrétome d'une part et celles constitutives du protéome d'autre part. Cette comparaison s'appuie sur l'analyse d'images de gels 2-D DIGE.

De plus, nous disposons de sérum de bovins trypanosensibles (Zébus) mais aussi trypanotolérants (Ndamas) ; l'utilisation de ces sérums avec la technique du Western Blot sur les gels 2D de nos sécrétomes et protéomes nous permettra de caractériser les protéines différenciellement reconnues par l'hôte.

2.2.2.1 Gel d'Electrophorèse Différentielle ou DIGE

L'électrophorèse différentielle (DIGE) est une variante de la technique d'électrophorèse 2-D. Les échantillons sont marqués avec différents fluorochromes avant la séparation. Un standard interne constitué du mélange de l'ensemble des échantillons à analyser est marqué par un fluorochrome particulier. Cette technique permet une analyse précise des différences d'abondance de chaque protéine entre les échantillons (figure 12).

Chaque fluorochrome (CyDye DiGE Fluor Kit, GE Healthcare™) se fixe de façon covalente et par l'intermédiaire d'une liaison amide à une seule lysine par protéine, ce qui fait que 2 à 3% des protéines totales sont marqués (« minimal labelling »). Les échantillons à comparer sont mélangés à part égale pour constituer le standard interne, puis marqués chacun par un fluorochrome spécifique ; les protéines sont séparées par électrophorèse bidimensionnelle classique (voir paragraphe 2.2.1.2) sur un seul et unique gel.

2.2.2.2 Analyse d'image

- *Acquisition* : sitôt la migration achevée, l'acquisition de trois images correspondant respectivement aux échantillons A et B, marquées par Cy3 et Cy5, et du standard interne marqué par Cy2, est réalisée à partir du gel 2D sur un scanner TYPHOON 9400 (AMERSHAM BIOSCIENCES™).

- *Comparison* : les trois images produites (2 échantillons et le standard interne) sont comparées par les logiciels DeCyder© (AMERSHAM BIOSCIENCES) ou SAMESPOTS (NonLinear Dynamics Ltd). Une image composite est générée permettant l'identification des spots protéiques communs aux deux échantillons ou spécifiques de chaque échantillon étudié. Les variations de niveau d'expression des spots protéiques étudiés peuvent être quantifiées. Pour cela, le logiciel quantifie l'abondance de chaque spot protéique exprimée sur chaque image Cy3 et Cy5 et exprime pour chaque spot une valeur sous forme d'un ratio (Cy5/Cy3 ou vice versa).

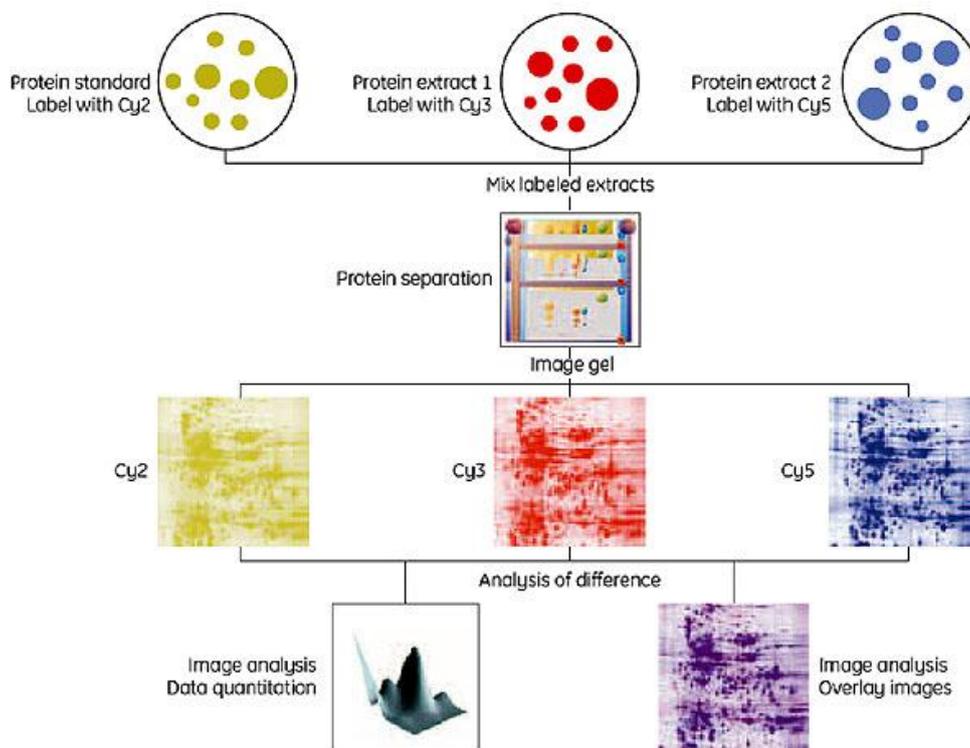


Figure 12. Etapes d'analyses d'images de gel 2D-DiGE (Jackie Vogel, CIAN McGill University, Montréal, CAN, <http://biology.mcgill.ca/CIAN/index.htm>)

2.2.2.3 Caractérisation des molécules d'intérêt

Pour chaque spot protéique, le volume normalisé est calculé par le logiciel DeCyder est utilisé pour comparer le niveau d'expression du spot par rapport à un standard interne (image Cy2). La normalisation permet de comparer les gels entre eux. A partir du ratio déterminé par le logiciel DeCyder on peut évaluer la variation du niveau d'expression entre les échantillons A et B. Les données volumes normalisées sont traitées par la fonction « K-means » intégrée dans le logiciel MeV

(TIGER™) afin de les classer en « clusters » en positionnant K "prototypes", ou "centroïdes" dans les régions du gel les plus peuplées. Chaque observation est alors affectée au prototype le plus proche (règle dite "de la Distance Minimale").

2.2.2.4 Immunocriblage 2D

Les méthodes de détection immuno-chimiques peuvent être appliquées sur les gels 1D et 2D. Dans un premier temps, il est nécessaire de procéder à un transfert et fixation des protéines sur une membrane (Towbin *et al.* 1979 ; Kyhse-Andersen, 1984). Les protéines immobilisées restent accessibles aux réactifs et/ou aux ligands tels que les anticorps ou les lectines.

Après activation de la membrane polyvinylidène difluoride (PVDF) avec du méthanol, celle-ci est lavée puis immergée dans le tampon de transfert Tris-Glycine. Elle est ensuite déposée sur la cathode sur l'appareil de transfert recouvert 6 feuilles de papier électrode (Ge HealthCare™) préalablement imbibées de tampon de transfert. Le gel est déposé sur la membrane, puis recouvert de 6 autres feuilles de papier électrode également imbibées. Après avoir chassé les bulles d'air, le montage est recouvert par l'anode. Le transfert est réalisé en 1h à 0,8 mA par cm² de gel, puis la membrane est lavée 3 fois dans un Tampon TBS (Tris Buffer Saline), puis séchée à température ambiante.

Une coloration au rouge ponceau a été réalisée pour vérifier que le transfert a bien été effectué. Les membranes sont ensuite saturées avec de la caséine afin de neutraliser tous les sites accessibles aux anticorps, puis ont été mises à incuber avec les sérums de bovins trypanosensibles et trypanotolérants en provenance de l'International Livestock Research Institute (ILRI, Nairobi, Kenya). Après l'ajout d'un conjugué anticorps de chèvre anti-bovins, couplé à de la Horseradish peroxydase (HRP), l'addition d'un substrat chimique s'associant à la peroxydase permet la libération d'un signal lumineux (figure 13).

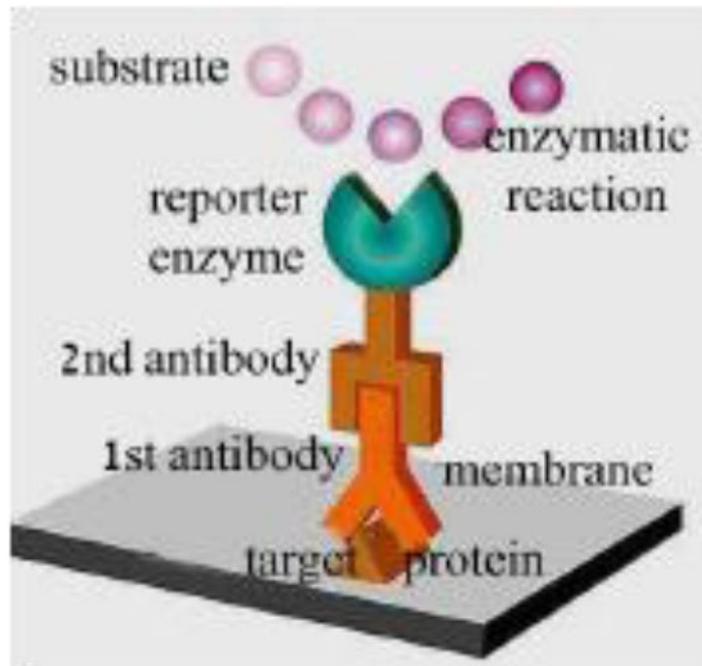


Figure13. Schéma de la réaction biochimique du Western blot (d'après http://biologie.univ-mrs.fr/upload/p64/TD_blotting.pdf).

CHAPITRE III. RESULTATS

3.1 Données Biologiques

Plusieurs paramètres ont été suivis à partir de prélèvements sanguins. Certains de ces paramètres sont caractéristiques de la pathogénicité (mesure de l'hématocrite, du taux de leucocytes, du poids vif, de la température corporelle et du taux de survie) ; d'autres paramètres sont caractéristiques de la virulence (cinétique de croissance parasitaire). Virulence et pathogénicité sont caractéristiques de l'infectiosité des trypanosomes.

3.1.1 Suivis des infections à *T. congolense* chez le bovin

Le suivi des infections expérimentales sur bovins a été réalisé au Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone subhumide (CIRDES, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso), sous la direction du Dr. Zakaria Bengaly.

3.1.1.1 Virulence

L'observation des cinétiques de croissance parasitaire présentées dans la figure 14 A nous montre qu'à partir de l'apparition des premiers parasites le 40^e jour :

- IL1180 n'atteint qu'un pic de 13 000 parasites par ml de sang ; il faut attendre le 71^e jour post-infection et plusieurs petites poussées parasitémiques inférieures à 20 000 parasites par ml de sang, pour qu'IL1180 atteigne son pic maximal avec 85 000 parasites par ml de sang.
- IL3000 atteint son pic maximum dès le 42^e jour, avec 162 000 parasites par ml de sang ; jusqu'au 80^e jour, il va accomplir quatre vagues parasitémiques régulières (tous les dix jours) mais décroissantes.

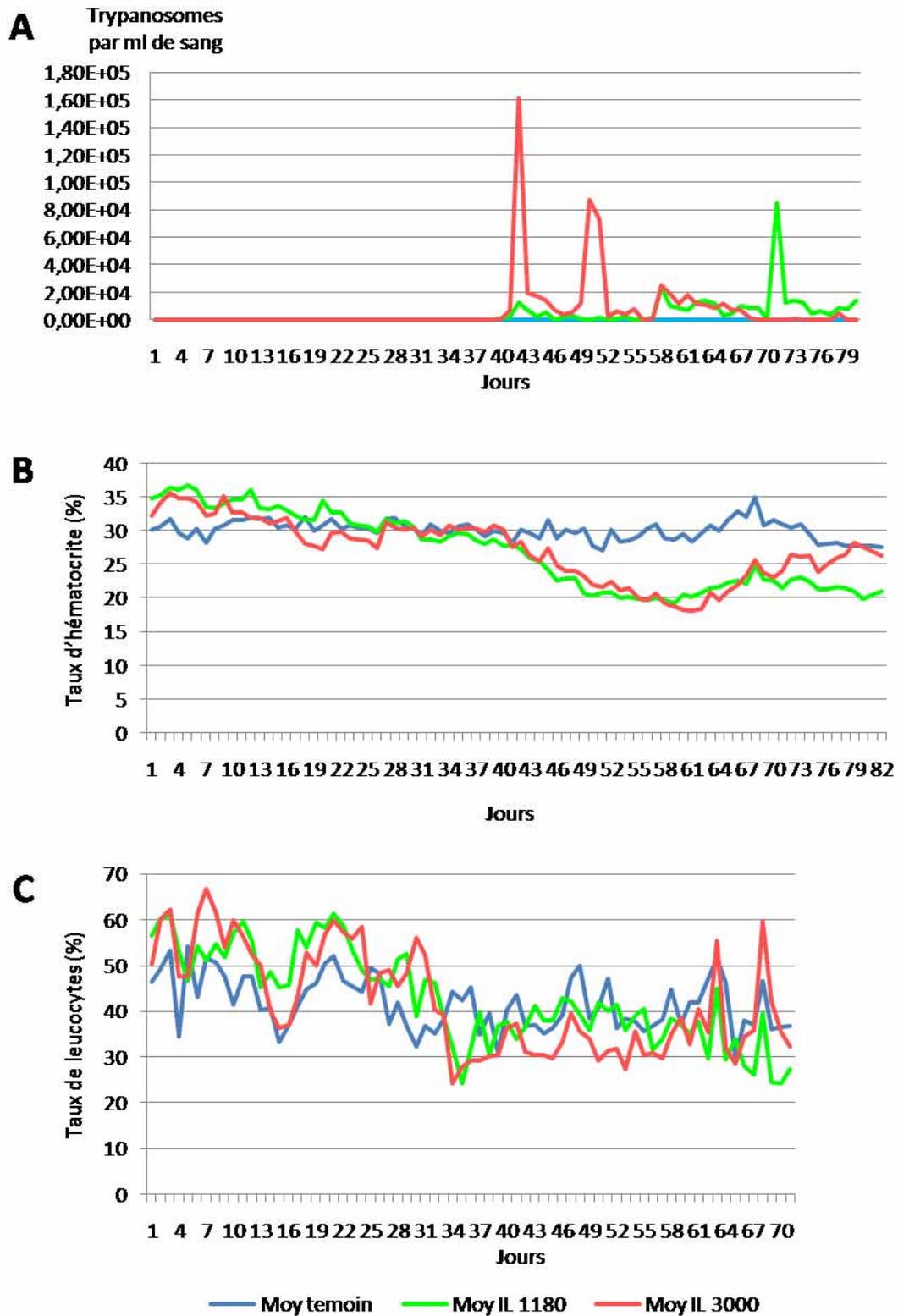


Figure 14. Evolution des indicateurs de pathogénicité et de virulence au cours des infections expérimentales bovines à *T. congolense* IL1180 et IL3000. A : parasitémie ; B : taux d'hématocrite ; C : taux de leucocytes.

3.1.1.2 Pathogénicité

Taux d'hématocrite

Le test de Kolmogorov-Smirnov à un seuil de sensibilité de 1% appliqué à l'ensemble des 82 observations quotidiennes de l'expérimentation présentées en figure 14B, confirme une différence significative entre : la distribution des taux d'hématocrite du lot témoin et celle du lot de bovins infectés par IL1180 ($D=0,488$; $p<0,0001$), celles du lot témoin et du lot infecté avec IL3000 ($D=0,488$; $p<0,0001$). Afin d'observer de manière plus précise l'évolution du taux d'hématocrite dans chacun des 3 lots de bovins, nous avons distingués 3 périodes :

- De J0 à J+41, l'application du test de Kolmogorov-Smirnov, confirme que les courbes des taux d'hématocrite moyens diffèrent de façon significative entre 2 lots de bovins : le lot infecté avec IL1180 et le lot témoin ($D=0,714$, $p<0,0001$).
- De J+42 à J+71, les taux d'hématocrite des 2 lots de bovins infectés chutent en-dessous de 30%, ce qui correspond à l'observation des premiers parasites et signe une anémie. Durant cette phase, les taux moyens d'hématocrites observés dans les lots infectés avec chacun des clones restent significativement différents de celui du lot de bovins témoins ($D=0,0967$, $p<0,0001$, pour le lot infecté avec IL1180 ; $D=0,933$, $P<0,0001$, pour le lot infecté avec IL3000). Notons que les taux d'hématocrite remontent en fin de cette période.
- A partir de J+72, le taux d'hématocrite moyen des bovins infectés par IL1180 qui était déjà inférieur à celui du lot témoin, rechute de manière significative par rapport à celui-ci ($D=1$, $p<0,0001$). C'est aussi au cours de cette phase qu'IL1180 atteint son pic parasitémique maximum. Le taux d'hématocrite des bovins infectés par IL3000 reste significativement différent de celui du lot témoin ($D=0,818$, $p<0,0001$), il augmente et rejoint le niveau de celui du lot témoin à J+78 ; On observe en même temps une quasi-disparition de la charge parasitaire avec ce clone. Il est aussi significativement différent de celui infecté par IL1180 ($D=1$, $p<0,0001$).

C'est grâce à une analyse par période qu'il a été possible pour la 1^e fois de distinguer une différence entre le taux d'hématocrite des bovins infectés par IL1180 et par IL3000.

Taux de leucocytes

L'application du test de Kolmogorov-Smirnov à un seuil de sensibilité de 1%, à l'ensemble des 71 observations quotidiennes présentées en Figure 14C, ne permet pas de distinguer de différences

significatives entre les taux de leucocytes des 3 lots de bovins. Nous avons donc choisi d'affiner notre analyse en distinguant 3 périodes :

- De J0 à J+33, les taux moyens de leucocytes des lots de bovins infectés diminuent et restent proches. Ils ne sont pas significativement différents entre eux, mais sont l'un et l'autre significativement supérieurs à ceux du lot témoin ($D=0,485$, $p<0,001$ pour le lot infecté avec IL1180 / lot témoin ; $D=0,455$, $p=0,002$ pour le lot infecté avec IL3000 / lot témoin).
- De J+34 à J+71, le taux moyen de leucocytes du lot de bovins infectés avec IL3000 chute et devient significativement inférieur à celui du lot témoin ($D=0,658$, $p<0,0001$). Dans le lot infecté par IL3000, on peut observer 2 pics parasitaires importants (J+42 et J+50) correspondant à un taux de leucocytes particulièrement faible. Dans le lot infecté par IL1180, autour de J+70, période au cours de laquelle on peut observer le pic parasitémique principal, on note un taux de leucocytes particulièrement faible.

3.1.2 Paramètres observés chez les rongeurs

La parasitémie est utilisée comme indicateur de virulence (Figure 15A), tandis que nous n'avons pu retenir que le taux d'hématocrite (Figure 15B) et de survie (Figure 15C) comme indicateurs de pathogénicité, en raison du taux mortalité important induit chez les rongeurs infectés par IL3000.

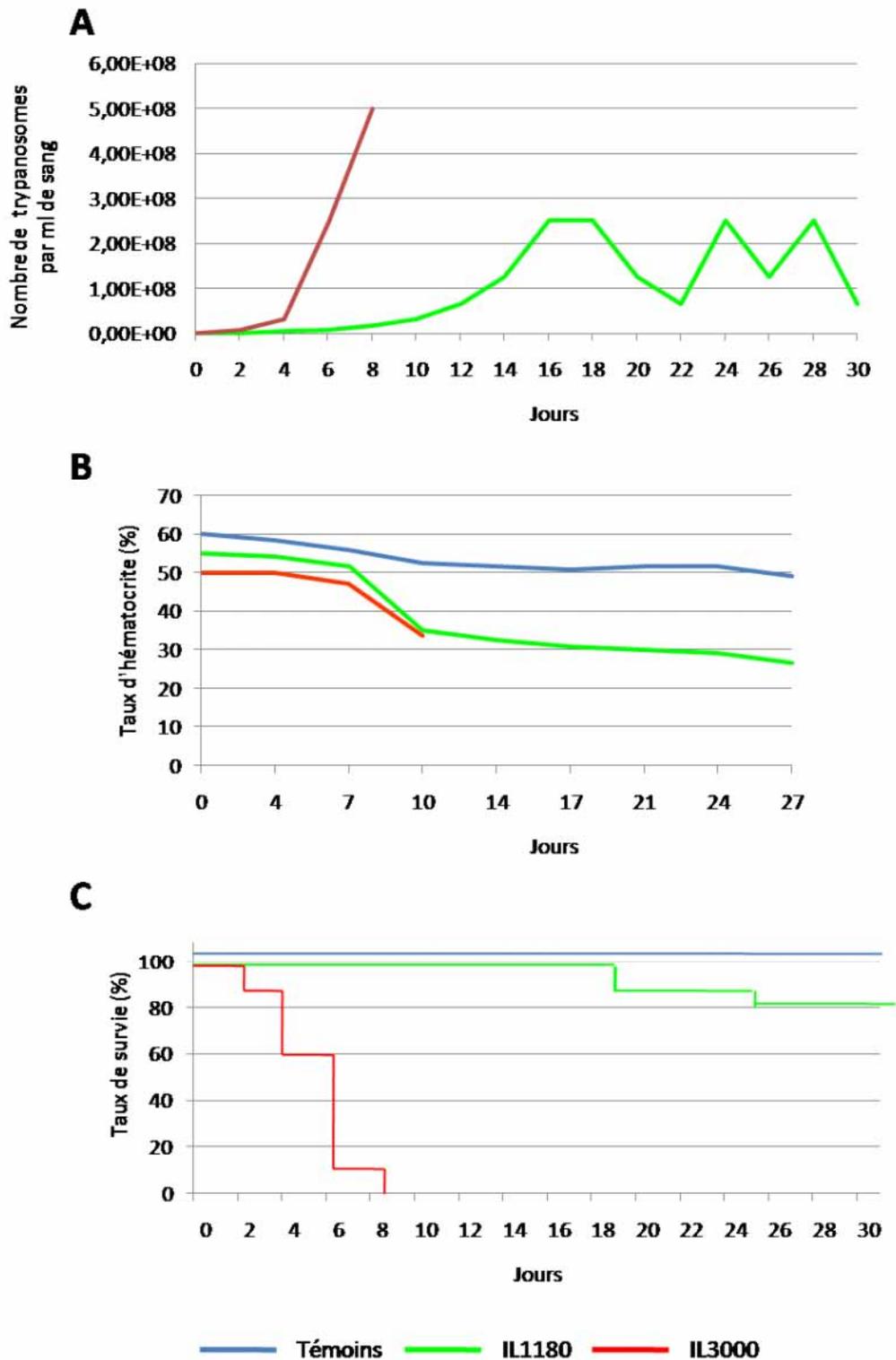


Figure 15. Evolution des indicateurs de pathogénicité et de virulence au cours des infections expérimentales à *T. congolense* IL1180 et IL3000 réalisées sur 3 lots de rongeurs. A : parasitémie ; B : taux d'hématocrite ; C : taux de survie.

3.1.2.1 Virulence

Chez le rat NUDE, les virulences d'IL1180 et d'IL3000 évoluent de manières très différentes (Figure 15A) : lente avec plusieurs vagues parasitémiques pour IL1180 (pic maximum à 250 000 trypanosomes par ml de sang à J+30) ; rapide et létale, avec des taux de parasitémie importants pour IL3000 (pic maximum à 500 000 trypanosomes par ml de sang total à J+8).

3.1.2.2 Pathogénicité

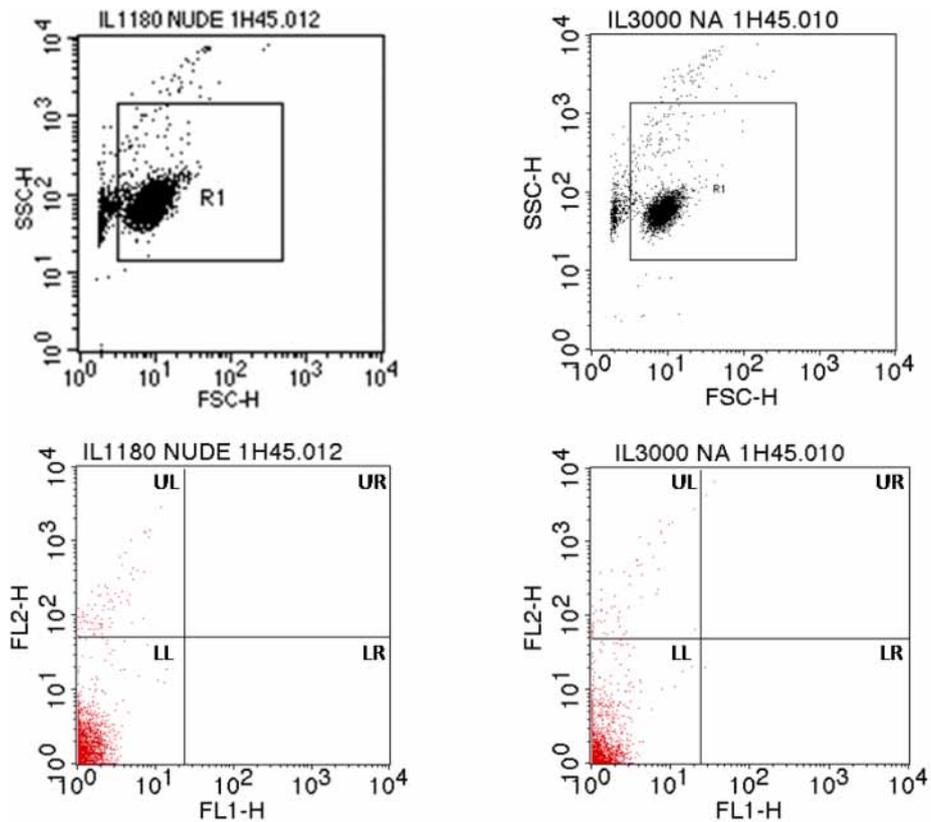
La mesure du taux d'hématocrite a été réalisée sur des souris Balb/c lors de l'isolement des souches parasitaires au CIRDES. L'évaluation du taux d'hématocrite sur le lot de souris infectées par IL3000 a pris fin au 10^e jour après inoculation du fait de la mort de l'ensemble des souris. Néanmoins, l'observation de la figure 15B met en évidence une chute de l'hématocrite une semaine après le début de l'infection expérimentale chez les souris infectées par les deux clones parasitaires.

L'observation des taux de survie chez les rats NUDE infectés par les deux souches (Figure 15C) montre que 80% des rongeurs infectés par IL1180 survivent encore 30 jours après inoculation. Par contre, 100% de mortalité sont atteints en 8 jours avec IL 3000, confirmant l'extrême pathogénicité de la souche.

L'observation des différents indicateurs de virulence et de pathogénicité met en évidence deux comportements entre les deux clones parasitaires, que ce soit chez les bovins ou chez les rongeurs : peu virulent et peu pathogène pour IL1180, très virulent et très pathogène pour IL3000. Le parallèle de comportements des deux souches parasitaires entre l'hôte naturel et l'hôte expérimental nous conforte dans le choix de ce dernier comme modèle expérimental dans les études analytiques.

3.2 Contrôle de qualité du sécrétome

Afin de valider que les protéines retrouvées dans le milieu sont bien des protéines excrétées /sécrétées naturellement et non des protéines issues de la lyse parasitaire, nous avons choisi d'évaluer le taux de survie et le dénombrement des trypanosomes dans le milieu de sécrétion.



File Name	Label	Events	% Gated	% Total
IL3000 NA 1H45.010	UL	150	1.46	1.27
	UR	6	0.06	0.05
	LL	10142	98.46	86.02
	LR	3	0.03	0.03
IL1180 NUDE 1H45.012	UL	214	1.81	1.62
	UR	0	0.00	0.00
	LL	11629	98.18	88.30
	LR	2	0.02	0.02

Figure 16. Contrôle de viabilité et du nombre de parasites en cytométrie de flux des souches IL1180 et IL3000 après 1h45 de sécrétion. Représentation en nuage de points des diffusions latérales (SSC-H) et frontales (FSC-H). R1: fenêtre ciblant les trypanosomes (% Gated), par rapport à l'ensemble des évènements (% Total). Représentation en nuage de points de l'émission de fluorescence captée par les détecteurs FL1-H et FL2-H.

Les résultats présentés dans la figure 16 portent sur deux sécrétions réalisées avec IL1180 et IL3000 respectivement les 9 et 20 octobre 2006 ; ils sont représentatifs des résultats des expériences de sécrétion. La fenêtre R1 (% Gated) permet de dénombrer les cellules viables ; cette proportion reste supérieure à 98% au bout d'1h45 minutes de sécrétion. Le pourcentage total (% Total)

correspond à l'ensemble des signaux captés. La viabilité ainsi que le nombre de parasites en incubation restent constants pendant 1h45 minutes d'incubation en milieu de sécrétion.

Les acquisitions réalisées montrent une très bonne viabilité des parasites (98%) dans le milieu de sécrétion, nettement supérieur au seuil critique fixé de 97%. Le nombre de parasites en sécrétion est resté constant ; précisons que les parasites ne se divisent pas dans le milieu de sécrétion.

3.2.1 Dosage de protéines

L'étude du sécrétome, sans influence de la réponse de l'hôte, nous contraint à limiter notre étude à la 1^e vague parasitémique, initiatrice de l'invasion de l'hôte.

Nous avons réalisé les dosages sur des lots définis par l'ensemble des sécrétions obtenues le même jour pour la même souche parasitaire et sur la même espèce de rongeur. Les dosages des protéines des sécrétomes, réalisés par la méthode de Bradford, nous permettent de quantifier les protéines du sécrétomes à 150 µg en moyenne par lot pour IL1180 contre 200 µg pour IL3000.

IL1180 ayant une cinétique de croissance parasitaire plus lente qu'IL3000, nous n'avons pu disposer que de 5 lots de sécrétions contre 12 pour IL3000.

La réalisation d'un gel en électrophorèse 1-D, coloré au nitrate d'argent nous permet de valider le contenu protéique de nos sécrétomes (Figure 17).

Le milieu de sécrétion a été mis au point avec des souches de *T. b. gambiense*, agent pathogène de la trypanosomiase humaine africaine, son sécrétome constitue notre référence.

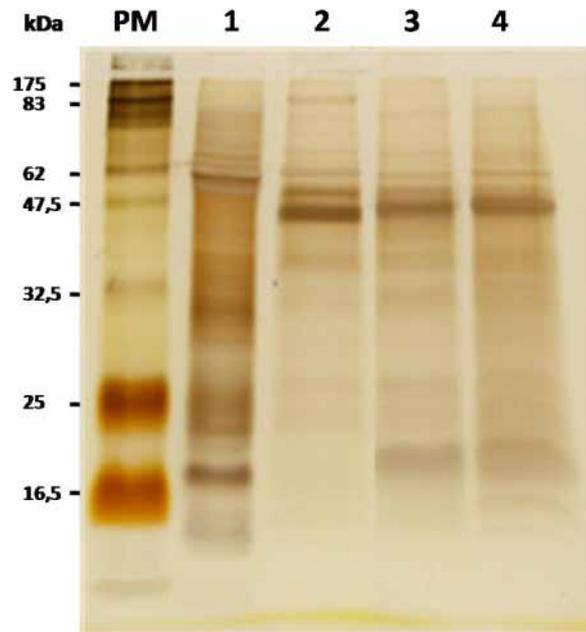


Figure 17. Gel de polyacrylamide coloré au nitrate d'argent des profils polypeptidiques du marqueur de poids moléculaire (PM), du secrétome de *T. b. gambiense* utilisé en référence (1), des secrétomes de *T. congolense* IL1180 (2), IL3000 (3 et 4).

On peut observer sur le gel de la figure 17, lorsque l'on compare les 2 lots de sécrétions d'IL3000, une bonne reproductibilité des profils 3 et 4.

La comparaison du profil de référence issu de *T. b. gambiense* (profil 1), trypanosome de l'homme et modèle de développement du milieu de sécrétion, avec ceux des 2 souches de *T. congolense* (profils 2,3-4) met en évidence des différences entre les 2 sous-genres de trypanosomes, *Trypanozoon* et *Nannomonas*.

La comparaison du profil 2 avec les profils 3 et 4, met en évidence autour de 83 kDa, 47,5 kDa et de 20 kDa, des différences entre les 2 souches de *T. congolense*.

3.3 Caractérisation moléculaire des protéines du sécrétome

Afin d'identifier les constituants protéiques du sécrétome, un prélèvement exhaustif des 40 bandes reconnues par le robot sur le gel a été réalisé. Exception faite de la bande 4 qui n'a abouti à aucune identification, l'analyse des constituants des 39 autres bandes en spectrométrie de masse a permis d'identifier, grâce aux informations présentes dans les bases de données SwissProt/TrEMBL, 181 protéines dans le sécrétome de *T. congolense* (voir Annexe 3).

- 51 (28,2%) protéines ont été identifiées dans SwissProt, elles correspondent à des protéines déjà caractérisées.
- 82 (45,3%) ont une caractérisation putative dans TrEMBL, elles correspondent à des transcrits séquencés.
- 48 (26,5%) sont putatives dans TrEMBL mais non caractérisées, elles correspondent à des séquences d'ADN pouvant théoriquement conduire à la séquence protéique identifiée.

L'inventaire exhaustif des différents types de protéines présentes dans le sécrétome de nos deux souches de *T. congolense* est présenté en Annexe avec l'ensemble des protéines non caractérisées mais identifiées dans TrEMBL.

Une revue de la littérature a permis de mettre en évidence certaines protéines caractérisées. Plusieurs ont été décrites pour leur propriétés immunoprotectrices, d'autres en tant que cibles thérapeutiques, et d'autres enfin pour leur implication dans l'infectiosité du parasite (Tableau II).

Tableau II. Liste des protéines identifiées en spectrométrie de masse (Q-TOF) sur l'ensemble des sécrétomes de *T. congolense* (IL1180 et IL3000) et déjà décrites dans la littérature en tant qu'immuno-protecteurs, cibles potentielles de chimiothérapie et pour leur rôle dans l'infectiosité chez *Trypanosoma*.

N° bande	Code TbDB	Entrée SwissProt/TrEMBL	Masse	Score	Peptide match	Identification
5	Tb10.70.0280	Q38AV5_9TRYP	59503	47	2	Chaperonin Hsp60, mitochondrial
6	Tb927.4.5010	Q584K4_9TRYP	45043	100	3	Calreticulin, putative
9	Tb927.4.4050	Q57Y09_9TRYP	76050	52	2	ABC transporter, putative
11	Tb09.160.4560	Q38EV2_9TRYP	44716	67	2	Arginine kinase
11	Tb927.8.3530	Q57YW0_9TRYP	37805	328	9	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], glycosomal
13	Tb10.70.2650	Q38BE4_9TRYP	94334	236	6	Elongation factor 2
15	Tb11.02.3210	Q385L6_9TRYP	26819	192	3	Triosephosphate isomerase
18	Tb09.160.3270	IF4A_TRYBB	45362	79	3	Probable eukaryotic initiation factor 4A
18	Tb927.2.1560	Q585R7_9TRYP	29592	57	3	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
20	Tb09.211.4511	Q38D58_9TRYP	11077	61	1	Kinetoplastid membrane protein KMP-11
22	Tb11.01.3110	Q383E5_9TRYP	75367	248	5	Heat shock protein 70
23	Tb10.26.1080	Q389P1_9TRYP	80763	555	16	Heat shock protein 83
23	Tb927.8.4970	Q57UH2_9TRYP	69597	156	4	69 kDa paraflagellar rod protein
23	Tb927.3.4290	Q580L2_9TRYP	68683	281	8	73 kDa paraflagellar rod protein
23	Tb11.02.1120	Q386E7_9TRYP	66675	87	1	Adenylosuccinate synthetase, putative
23	Tb10.6k15.2620	Q38AH1_9TRYP	60604	230	5	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
25	Tb10.406.0520	Q389T8_9TRYP	53157	53	1	Trypanothione reductase
25	Tb11.01.1350	Q383X0_9TRYP	48448	205	7	Adenosylhomocysteinase
26	Tb10.70.5800	Q38C41_9TRYP	51149	106	1	Hexokinase
27	Tb927.1.700	Q4GZG4_9TRYP	47246	96	4	Phosphoglycerate kinase
27	Tb927.6.4840	Q586G3_9TRYP	43540	40	1	S-adenosylmethionine synthetase, putative
28	Tb927.6.4280	Q586Z5_9TRYP	43869	216	7	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal
29	Tb10.70.1370	Q38B42_9TRYP	41071	280	6	Fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative
29	Tb11.02.5400	Q384R5_9TRYP	39464	51	2	cystathionine beta-synthase, putative
29	Tb10.6k15.3850	Q38AR9_9TRYP	35611	181	4	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
33	Tb927.1.2330	Q4GY6_9TRYP	49704	65	2	Beta tubulin
36	Tb927.8.1990	Q9GU47_9TRYP	25632	201	5	Tryparedoxin peroxidase
37	Tb11.03.0250	Q387G2_9TRYP	18717	38	1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase

En vert : cibles potentielles de chimiothérapie ; **en jaune** : protéines à potentiel immunoprotecteur ; **en bleu** : protéines impliquées dans la pathogénicité et la virulence

- Huit protéines ont été décrites dans la littérature pour leurs propriétés immunoprotectrices contre *T. congolense*, cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative (Pellé *et al.*, 2002) mais aussi d'autres parasites (*Leishmania*, *Plasmodium*, *T. cruzi*, *T. evansi*, *T. equiperdum*, *T. brucei*) : eukaryotic initiation factor 4A (Probst *et al.*, 1997), kinetoplastid membrane protein KMP-11 (Basu *et al.*, 2005 ; Carrillo *et al.*, 2008) ; heat shock protein 70 (Qazi *et al.*, 2005 ; Morell *et al.*, 2006 ; Carrillo *et al.*, 2008) ; heat shock protein 83 (Gupta *et al.*, 2007) ; 69 kDa paraflagellar rod protein (Wrightsmann *et al.*, 2002) ; 73 kDa paraflagellar

rod protein (Carrillo *et al.*, 2008) ; beta tubulin (Li *et al.*, 2007). De plus, KMP-11 et HSP70 sont aussi identifiées comme marqueurs diagnostic potentiels de *Leishmania* et *T. cruzi* (Trujillo *et al.*, 1999), et de *T. congolense* (Boulangé *et al.*, 2002 ; Bannai *et al.*, 2003).

- Dix-sept Protéines sont décrites en tant que cibles chimio thérapeutiques potentielles contre *T. congolense*, ABC transporter, putative (Delespaux *et al.*, 2005), glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], glycosomal (Nok, 2002) ; et d'autres *Trypanosomatidae*, arginine kinase (Pereira *et al.*, 2002), adenylosuccinate synthetase, putative (Spector *et al.*, 1982) ; *T. brucei*, elongation factor 2 (Scory et Steverding, 1997) ; 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (Chevalier *et al.*, 2000) ; trypanothione reductase (Heby *et al.*, 2007) ; adenosylhomocysteinase (Rapp *et al.*, 2006) ; hexokinase (Chambers *et al.*, 2008) ; phosphoglycerate kinase (Drew *et al.*, 2003) ; S-adenosylmethionine synthetase, putative (Yarlett *et al.*, 1993) ; fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative (Forget *et al.*, 2006) ; trypanedoxin peroxidase (Guerrero *et al.*, 2000) ; peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Bua *et al.*, 2008). anti-*Trypanosomatidae* triosephosphate isomerase (Espinoza-Fonseca et Trujillo-Ferrara, 2004) ; cystathionine beta-synthase, putative (Yarlett et Bacchi, 1988), et Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic (Berriman *et al.*, 2005) qui caractérise deux protéines.
- Trois protéines sont connues pour leur implication dans la pathogénicité et la virulence : calreticulin chez *T. cruzi* (Aguillón *et al.*, 2000) et HSP60 chez *T. brucei* (Radwanska *et al.*, 2000) et cyclophilin type A chez *T. congolense* (Pellé *et al.*, 2002), déjà identifiée pour ses propriétés immuno-protectrices.

Nos travaux permettent de présenter pour la première fois une liste des protéines excrétées / sécrétées par deux souches de l'espèce *T. congolense* et du sous-genre *Nannomonas*. Parmi les 181 identifications obtenues 28 sont déjà connues pour leur potentiel infectieux, immunoprotecteur ou en tant que cible chimiothérapeutique dans d'autres parasitoses. Mis à part le cas de la cyclophiline de type A, ces qualités n'ont pas encore été étudiées dans le cadre des trypanosomoses à *T. congolense*. A ces 28 protéines d'intérêt s'ajoutent les 104 qui ont été identifiées et caractérisées mais jamais décrites avec des propriétés connues dans le cadre des trypanosomoses à *T. congolense*.

3.4 Aspects fonctionnels des protéines caractérisées

Nous avons entamé un travail préliminaire afin d'associer aux protéines une fonction. Nous avons effectué des recherches grâce au serveur « ProtFun 2.2 » dans les bases de données « Protein Domain » et « Gene Ontology », bases de référence sur les fonctions cellulaires, notamment :

- « Protein Domain » propose une recherche d'homologie de domaines fonctionnels (Figure 19) ;
- « Gene Ontology » propose une classification des gènes codants les protéines en fonction des processus cellulaires (Figure 20).

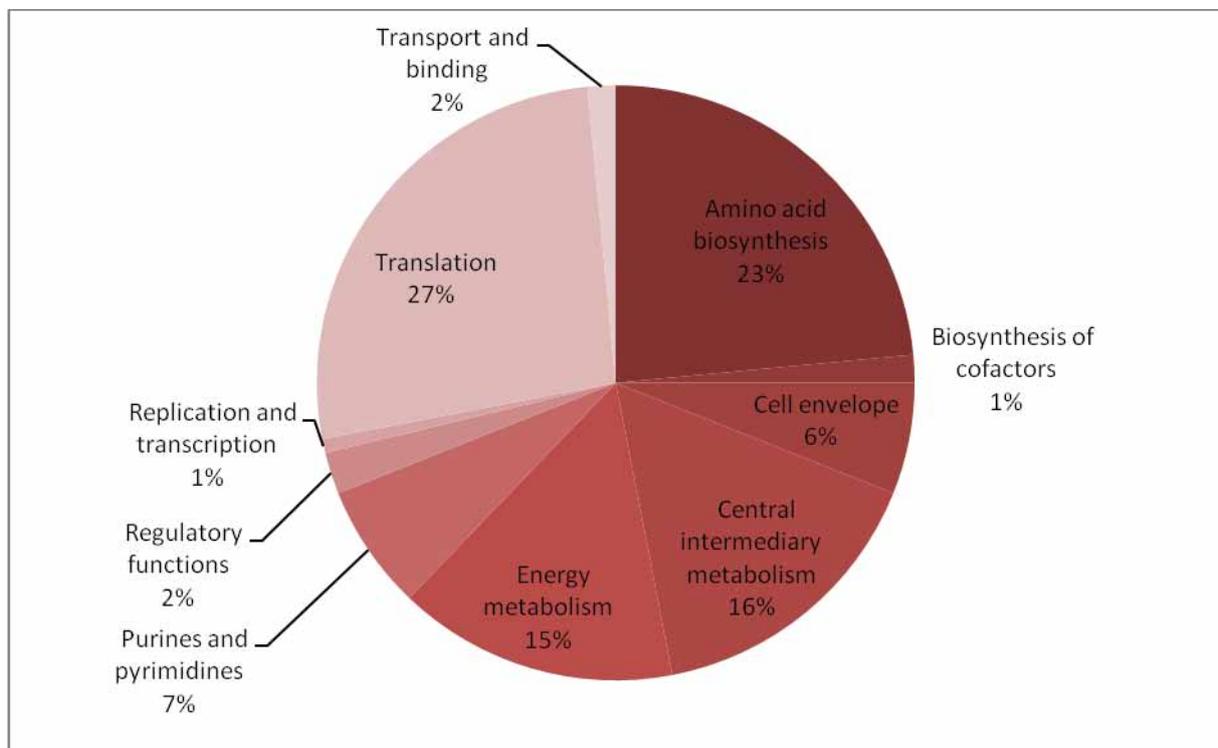


Figure 19. Identification des domaines fonctionnels des protéines du sécrétome d'IL1180 et d'IL3000 en relation avec les domaines fonctionnels cellulaires de référence de « ProteinDomain »

Cent-trente deux protéines identifiées du sécrétome de *T. congolense* ont pu être associées à 10 grands domaines fonctionnels cellulaires : la biosynthèse d'acides aminés, la biosynthèse de cofacteurs, l'enveloppe cellulaire, le métabolisme central intermédiaire, le métabolisme énergétique, la production de purines et de pyrimidines, les fonctions régulatrices, la réplication et la transcription, la traduction, le transport et l'accrochage.

On peut remarquer dans la figure 19 que les domaines fonctionnels attribués aux protéines identifiées dans le sécrétome concernent pour la moitié d'entre elles la traduction (26%) et la biosynthèse d'acides aminés (23%). Les fonctions concernant le métabolisme central intermédiaire (16%) et le métabolisme énergétique (15%) ont été attribuées à 31% des protéines identifiées. 6% des protéines ont été affectées à une fonction associée à l'enveloppe cellulaire et 7% à la synthèse des bases puriques et pyrimidiques.

Dans la classification présentée Figure 20, nous avons choisi de distinguer en rouge plusieurs catégories qui nous paraissent surprenantes pour les protéines extra-cellulaires du sécrétome : les protéines structurales (7%), celles en charge de la régulation de la transcription (3%), celles impliquées dans les canaux ioniques (1%), les canaux ioniques voltage dépendant (1%) et les canaux cationiques (1%).

Par contre, il est plus attendu de trouver des protéines du sécrétome (en vert) impliquées dans les facteurs de croissance (17%), la réponse immune (7%), la réponse au stress (1%), le transport (1%), les hormones (1%) et la transduction du signal (1%).

Enfin, 59% des protéines identifiées n'entrent pas dans cette classification de « Gene Ontology », ce qui nous paraît peu surprenant compte-tenu du statut des protéines solubles du sécrétome.

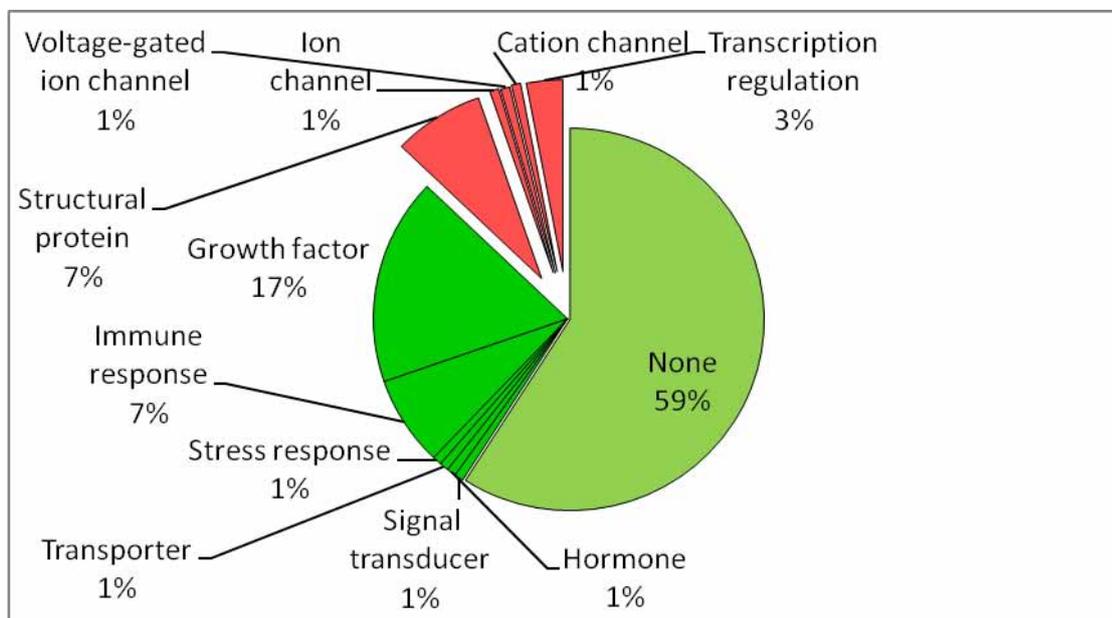


Figure 20. Classification des protéines des sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000 en fonctions cellulaires de référence par Gene Ontology.

Cette première caractérisation du sécrétome de *T. congolense* a permis d'identifier un grand nombre de protéines. Afin de mieux cibler les protéines qui sont impliquées dans le processus infectieux chez l'hôte mammifère, nous avons utilisé un filtre analytique supplémentaire : l'étude de l'expression différentielle des sécrétomes et des protéomes des deux clones parasites.

3.5 Caractérisation moléculaire du différentiel d'expression des sécrétomes et des protéomes

3.5.1 Sécrétomes

3.5.1.1 Cartographie et quantification des sécrétomes en gel bidimensionnel

Ce sont 820 spots qui ont été sélectionnés à l'aide du logiciel SameSpots sur les images de gels DIGE scannés. L'ensemble des spots des gels de la figure 21 a été quantifié et leur mesure a été normalisée par rapport au standard interne marqué au fluorochrome Cy2. Le différentiel d'expression des sécrétomes des deux clones parasitaires est présenté sur les gels de la figure 21.

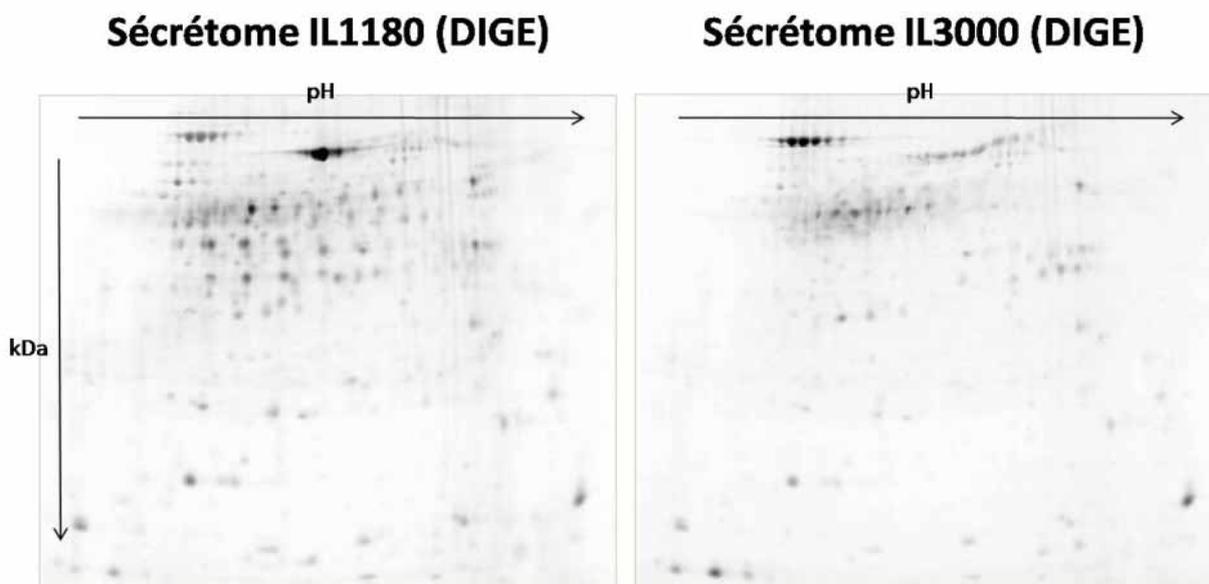


Figure 21. Images des gels 2-D DIGE des sécrétomes de *T. congolense* des souches IL1180 et IL3000.

3.5.1.2 Classification et sélection des protéines selon leur différentiel d'expression

Les données de quantifications normalisées des deux souches parasitaires ont été utilisées pour regrouper les protéines en classes selon leur différentiel d'expression par la méthode des « k-means » (logiciel MeV). Le nombre de classes retenu est égal à 10. En effet si $n < 10$, certaines classes

contiennent des données hétérogènes ; si $n > 10$ on observe un sur-échantillonnage des comportements.

Les 10 classes obtenues, présentées en figure 22, englobent 820 protéines sélectionnées par SameSpots. Les classes 2, 3 et 6 regroupent les protéines ayant un niveau d'expression plus important pour IL1180 (62 spots), et les classes 1, 4 et 5 les protéines ayant un niveau d'expression plus important pour IL3000 (35 spots).

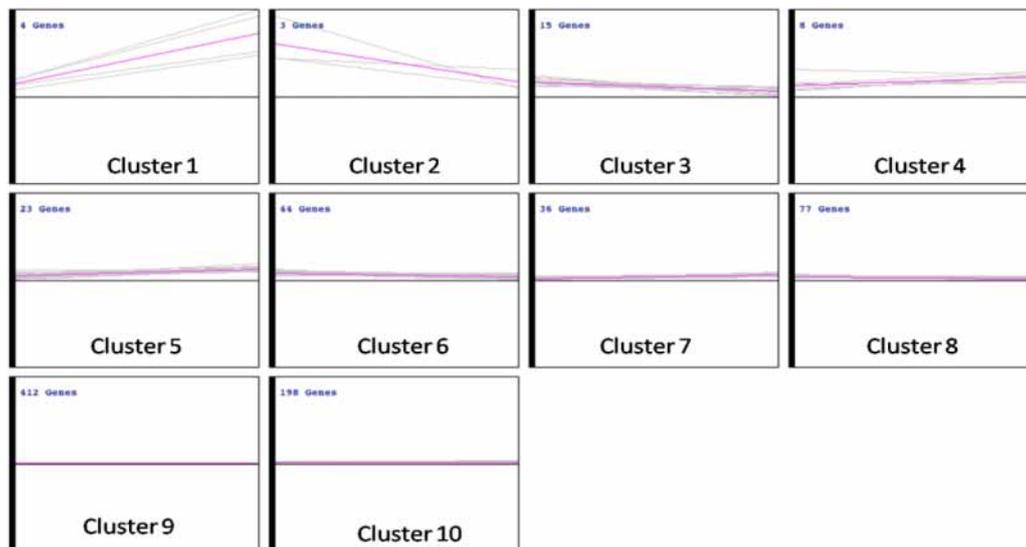


Figure 22. Classification en fonction du différentiel d'expression des protéines des sécrétomes des souches de *T. congolense* IL1180 et IL3000.

Notre objectif était d'analyser en spectrométrie de masse les 30 spots protéiques présentant les différentiels d'expression les plus importants, regroupées dans les classes 1 à 4. La sensibilité de la coloration au bleu de coomassie étant beaucoup plus faible que celle des fluorochromes de la DIGE, il ne nous a pas été possible de piquer avec certitude l'ensemble des 30 spots des classes 1 à 4. Nous avons donc étendu le piquage à plusieurs spots des classes 5 et 6 pour atteindre l'objectif d'une trentaine prélèvements ($n=32$, tableau IV).

Tableau IV. Répartition en classes des protéines présentant les différentiels d'expression les plus marqués entre les sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000.

Classes	Protéines plus exprimées chez IL1180	Protéines plus exprimées chez IL3000
1		S30, S25, S29, S39
2	S9, S57, S1479	
3	S708, S4, S147, S639, S204, S2, S23, S50 , S103, S717, S1157 , S1425, S1573, S1907 , S11	
4		S714, S1193, S266, S274, S323, S538 , S1569, S1630
5		S40 , S64, S238, S313, S632 , S780, S836, S5, S306, S683, S969, S1469, S24 , S259, S315, S55, S828 , S32, S283, S371, S572 , S31, S1600
6	S22, S125, S289, S685, S958, S1055, S1337, S1380 , S1419, S1481, S1641, S1758, S1865, S1891, S7, S19, S60, S83 , S148, S413, S1016, S1202, S1271 , S1426, S1532, S1587 , S1746, S1833 , S26, S98, S132 , S8, S1433, S1768, S1550, S1694, S347, S608, S3, S1538, S1417 , S164	

Les n° correspondent aux identifications des spots détectés par SameSpots dans le sécrétome (S). En gras : spots prélevés et analysés en spectrométrie de masse.

3.5.1.3. Identification et caractérisation des protéines d'intérêt des sécrétomes

L'analyse en spectrométrie de masse (Tableau IV) des 32 spots a permis d'établir 37 identifications. En effet, 5 spots ont donné lieu à l'identification de 2 protéines de même masse et de même point isoélectrique. Parmi ces 37 identifications, 8 ne sont pas encore caractérisées, 13 sont putatives dans la base TrEMBL et 24 sont caractérisées dans la base de données SwissProt, dont 13 sur *T. congolense*.

Tableau V. Identification des protéines surexprimées dans les gels 2-D DIGE des sécrétomes d'IL1180 et IL3000.

Ref. DIGE	Classe	Masse	Pi	Score	% cover	Peptid match	Identification
S39	1	47488	5,07	102	23		Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor
S30	1	167172	ND	40		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S29	1	50413	4,72	214		7	P04107 TBB_TRYBR Tubulin beta chain
S29	1	50383	4,93	88		1	P04106 TBA_TRYBR Tubulin alpha chain
S25	1	47488	5,07	102	23		Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor
S274	4	47488	5,07	120	26		Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor -
S323	4	54969	5,36	166	37		Q26976/VATB_TRYCO Vacuolar ATP synthase subunit B
S538	4	48981	6,47	56	10		Q26895/Q26895_TRYCO Cystéine protéase precursor
S1193	4	48205	7,83	123		3	Q9XZF8/Q9XZF8_TRYCO Cysteine protease - <i>Trypanosoma congolense</i>
S1193	4	34799	5,3	112		3	Q5ZPD4 Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
S266	4	95300	5,83	46	9		Q38BE4/Q38BE4_9TRYP Elongation factor 2
S55	5	167172	ND	41		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S40	5	47133	5,93	189		6	Q9NDH8 Q9NDH8_TRYBB Enolase
S24	5	167172	ND	41		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S632	5	69500	6,24	44	14		Q4DPU7/Q4DPU7_TRYCR NADPH-dependent FMN/FAD containing oxydoreductase, putative
S572	5	40457	6,73	46		4	O96507/KARG_TRYCR Arginine kinase - <i>Trypanosoma cruzi</i>
S315	5	95300	5,83	44	10		Q38BE4/Q38BE4_9TRYP Elongation factor 2
S828	5	54969	5,36	268	56		Q26976/VATB_TRYCO Vacuolar ATP synthase subunit B
S9	2	61107	5,63	77	18		Q9NG18/Q9NG18_TRYBB 2,3-biphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase
S57	2	61107	5,63	77	18		Q9NG18/Q9NG18_TRYBB 2,3-biphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase
S1479	2	34799	5,3	118		4	Q5ZPD4 Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
S1479	2	48981	6,47	48		1	Q26895 Q26895_TRYCO Cysteine protease precursor - <i>Trypanosoma congolense</i>
S1157	3	167172	ND	43		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S50	3	58501	5,28	236		7	Q38AE5 Q38AE5_9TRYP T-complex protein 1, theta subunit, putative
S50	3	61107	5,63	146		5	Q9NG18 Q9NG18_TRYBB 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
S1573	3	61107	5,63	77	18		Q9NG18/Q9NG18_TRYBB 2,3-biphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase
S717	3	34799	8,92	98	33		Q5ZPD4/Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
S1907	3	37966	4,72	66		1	Q383W8/Q383W8_9TRYP Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, putative
S132	6	35311	5,99	166	53		O96653/O96653_TRYCO Activated protein kinase C receptor homolog
S1271	6	46871	5,92	58	23		Q4DZ98/Q4DZ98_TRYCR Enolase, putative
S1380	6	80622	11,15	61	15		Q38DN6/Q38DN6_9TRYP Putative uncharacterized protein
S1833	6	49101	6,06	49	14		Q383X0/Q383X0_9TRYP Adenosylhomocysteinase
S98	6	167172	ND	46		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S83	6	167172	ND	43		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S1417	6	167172	ND	46		1	Q4DNF1/Q4DNF1_TRYCR Putative uncharacterized protein
S1587	6	56122	5,12	72		1	Q385B0 Q385B0_9TRYP Aminopeptidase, putative
S1587	6	46787	6,72	59		1	Q26979 Q26979_TRYCO Variable surface glycoprotein precursor

Les protéines les plus exprimées dans le sécrétome d'IL1180 par rapport à celui d'IL3000 sont: 2,3-biphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase (Chevalier *et al.*, 2000), glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (El Sayed *et al.*, 2005), cysteine protease precursor - *Trypanosoma congolense* (Q26895), T-complex protein 1, theta subunit (El Sayed *et al.*, 2005), eukaryotic translation initiation factor 3 subunit (El Sayed *et al.*, 2005), activated protein kinase C receptor homolog (O96653), enolase (El Sayed *et al.*, 2005), adenosylhomocysteinase (El Sayed *et al.*, 2005), aminopeptidase (El Sayed *et al.*, 2005), variable surface glycoprotein precursor (Rausch *et al.*, 1994).

Parmi les protéines étant plus exprimées dans le sécrétome d'IL3000 par rapport à celui d'IL1180, on retrouve : calreticulin precursor (Q967S4), tubulin beta & alpha chain (Kimmel *et al.*, 1985), vacuolar ATP synthase subunit B (Q26976), cystein protease precursor (Q26895), cystein protease (Downey *et al.*, 1999), glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (El Sayed *et al.*, 2005), elongation factor 2 (Berriman *et al.*, 2005), enolase (Hannaert *et al.*, 2000), NADPH-dependent FMN/FAD containing oxydoreductase (El Sayed *et al.*, 2005), Arginine kinase – *T. cruzi* (Pereira *et al.*, 2000).

La figure 23 présente une carte de la répartition des protéines identifiées avec leur classe d'appartenance, représentative des sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000.

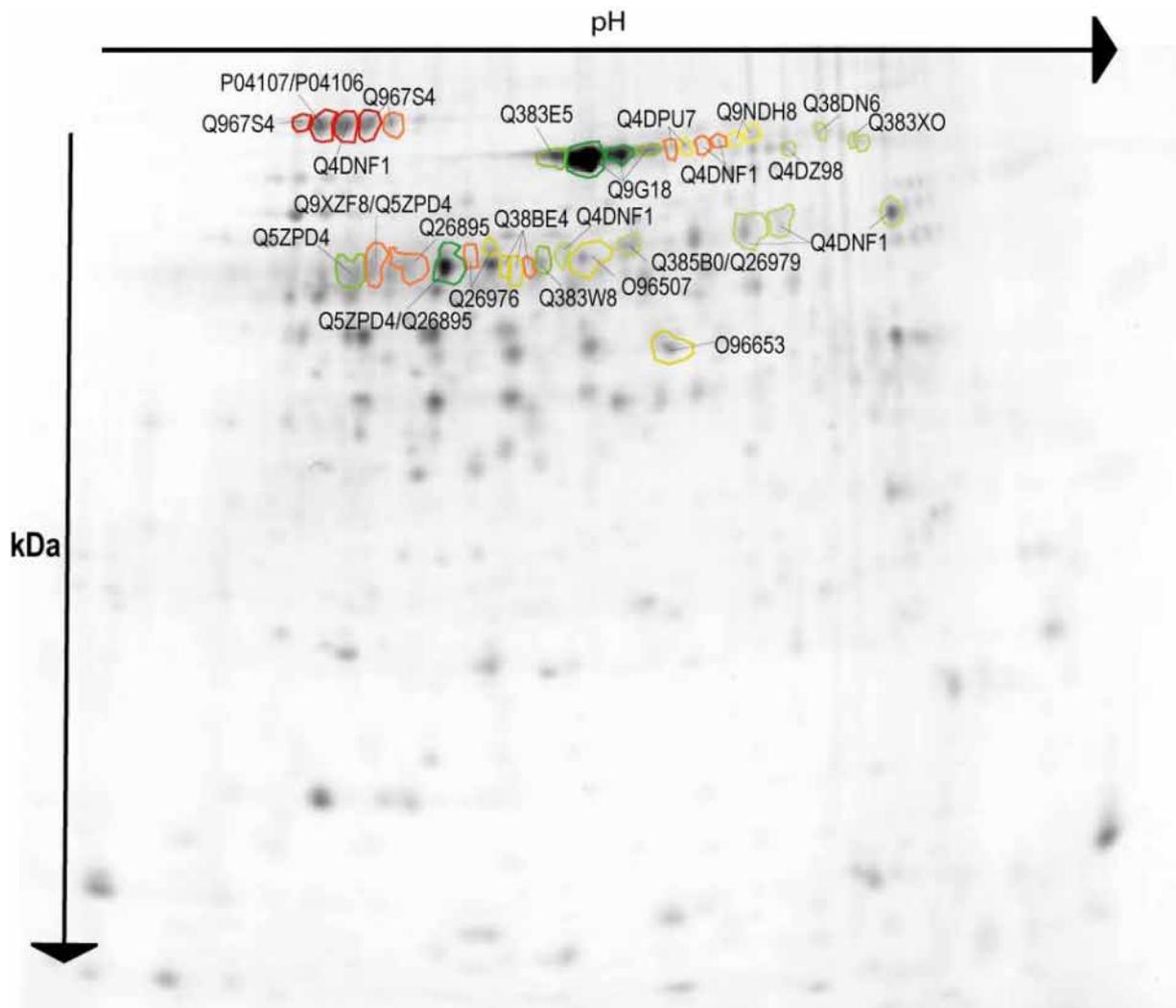


Figure 23. Protéines identifiées dans les sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000 et reportées sur une image de gel DIGE des sécrétomes. Le code couleur est identique à celui du tableau V.

La présence d'un certain nombre de chapelets de même poids moléculaire répondant à une même identification (exemples : Q967S4, Q5ZPD4, Q9G18, etc...), correspondent à des isoformes présentant des degrés de phosphorylation différents.

3.5.2 Protéomes

3.5.2.1 Cartographie et quantification des sécrétomes en gel bidimensionnel

L'ensemble des spots de la figure 24 a été quantifié et leur mesure a été normalisée par rapport au standard interne marqué au fluorochrome Cy2. On peut observer un différentiel d'expression entre les deux clones parasitaires.

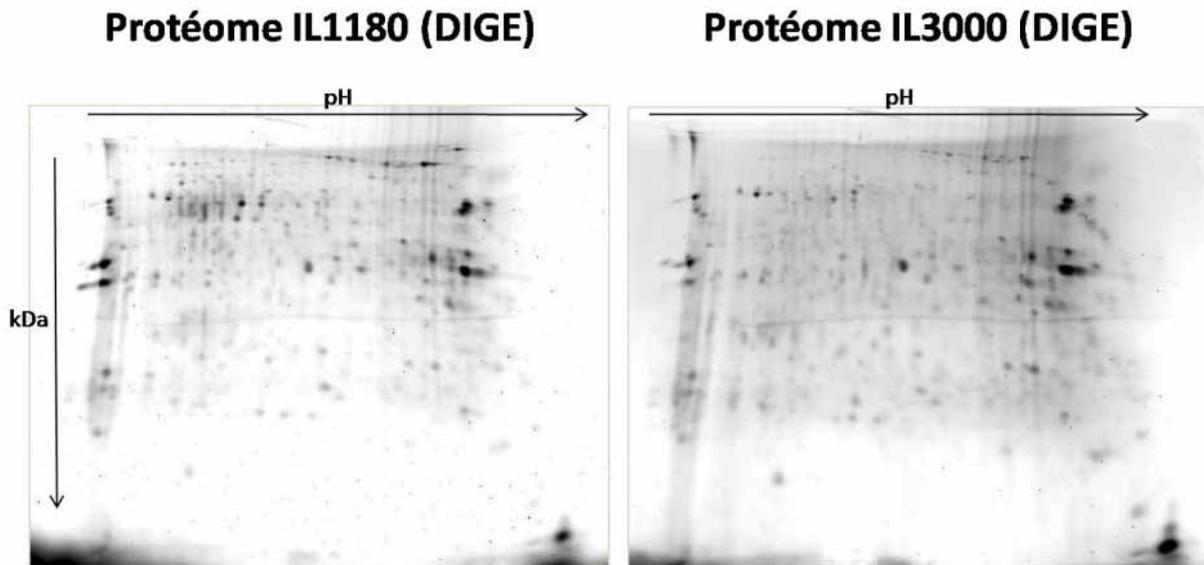


Figure 24. Images des gels 2-D DIGE des protéomes de *T. congolense* des souches IL1180 et IL3000.

3.5.2.2. Classification et sélection des protéines selon leur différentiel d'expression

Après avoir effectué la quantification une sélection à l'aide du logiciel SameSpots, 426 spots ont été sélectionnés puis regroupés en classes par la méthode des « K-means ». Comme pour le sécrétome, 10 regroupements ont été suffisants pour traduire le différentiel des niveaux d'expression (figure 25). Le Tableau V présente les 5 classes de comportements qui regroupent les 66 protéines impliquées dans les différentiels d'expression les plus importants entre les protéomes de chacun des deux clones (Tableau V) : 3 et 6 pour IL1180 (17 spots) ; classes 1, 2, 5 pour IL3000 (36 spots).

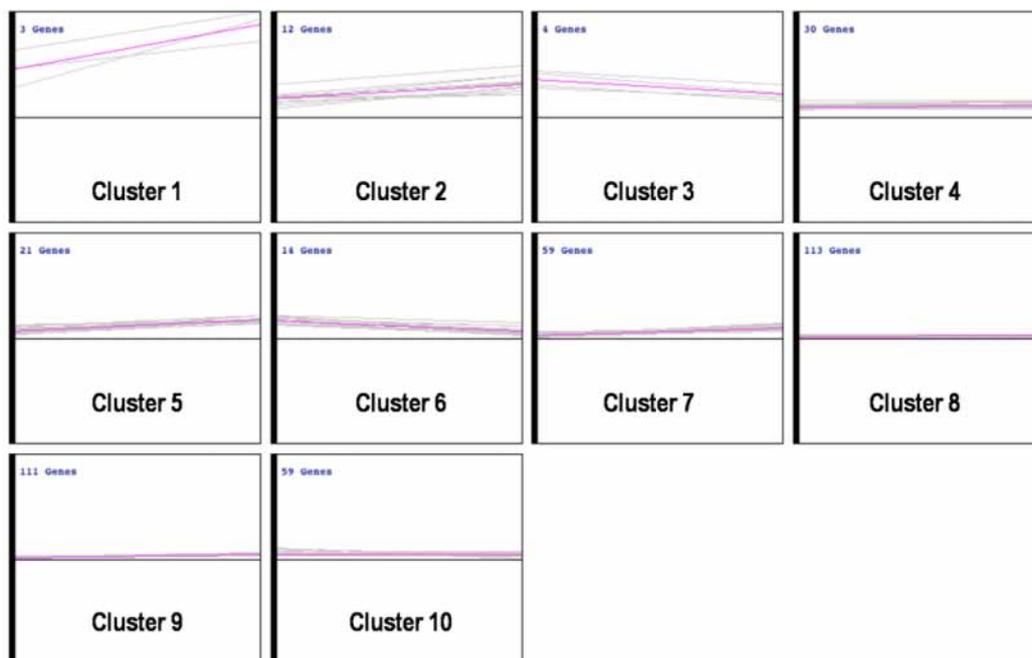


Figure 25. Classification des protéines exprimées dans le protéome des souches de *T. congolense* IL1180 et IL3000 en fonction de leur niveau d'expression relatif (Volume / Aire).

Pour des raisons de priorité donnée à l'analyse du sécrétome et des raisons de coût financier des analyses en spectrométrie de masse, nous avons limité l'analyse du protéome à 30 spots par la seule technique de MALDI-TOF. La sélection a porté sur les spots appartenant aux classes présentant les différentiels les plus marqués (1, 2, 3, 5 et 6).

Tableau VI. Répartition par classes des protéines exprimées différemment dans les protéomes d'IL3000 et d'IL1180.

Classes	Protéines plus exprimées chez IL1180	Protéines plus exprimées chez IL3000
1		P756A, P756B, P535, P754
2		P444, P947, P911, P296, P681, P432, P393, P804, P857, P895, P990, P1021, P740
3	P97, P55, P65, P125	
5		P519, P778, P967, P328 , P376, P382, P530 , P879, P889 , P1047, P1106 , P1109, P1118, P85, P225, P510, P869, P1023, P1064, P667, P616
6	P23, P40, P13 , P14, P31, P15, P19 , P44, P50, P51, P77 , P83, P94 , P99	

Les n° correspondent aux identifications des spots détectés par DeCyder dans le sécrétome (S). En gras : spots prélevés et analysés en spectrométrie de masse.

Quinze spots n'ont pas donné lieu à une identification MALDI. Une seule identification est putative et non encore caractérisée (P857). A partir des 30 spots piqués sur le gel, l'analyse en spectrométrie de masse a permis d'obtenir 17 identifications, dont 2 contiennent 2 protéines différentes (Tableau VII). Sur ces 17 identifications, 12 ont été obtenues à partir des données SwissProt de *T. congolense*.

Tableau VII. Identification des protéines surexprimées dans les gels DIGE des protéomes d'IL1180 et d'IL3000.

N° DIGE	Classe	Masse Théorique	Pi	Score	% couverture	Identification
P535	1	16828	4,1	97	49	P69097/CALM_TRYBB Calmodulin
P754	1	47488	5,07	129	28	Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor
P756 A	1	48981	6,47	46	15	Q26895/Q26895_TRYCO Cystéine protéase precursor
P444	2	50413	4,72	105	25	P04107/TBB_TRYBR Tubulin beta chain
P740	2	50383	4,93	180	43	P04106/TBA_TRYBR Tubulin alpha chain
P804	2	57029	8,96	127	26	Q75T26/Q75T26_TRYCO Glycerol kinase
P857	2	41003	5,29	61	19	Q587D3/Q587D3_9TRYP putative uncharacterized
P895	2	71080	5,1788	88	25	Q26906/Q26906_TRYCO P69 Antigen (c ter)
P1021	2	48981	6,47	46	13	Q26895/Q26895_TRYCO Cystéine protéase precursor
P328	5	47488	5,07	78	15	Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor
P1106	5	34799	8,92	58	25	Q5ZPD4/Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde
P55	3					Pas d'identification MALDI
P65	3	38386	8,92	52	18	P90593/GPDA_TRYBB Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+), glycosomal
P97	3	71080	5,1788	185	33	Q26906/Q26906_TRYCO P69 Antigen
P125	3	57029	8,96	130	30	Q75T26/Q75T26_TRYCO Glycerol kinase
P125	3	34799	8,92	58	25	Q5ZPD4/Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde
P94	6	57029	8,96	127	26	Q75T26/Q75T26_TRYCO Glycerol kinase
P94	6	34799	8,92	58	25	Q5ZPD4/Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde

Onze spots, sur les 21 exprimés de façon plus importante dans le protéome d'IL1180, (classes 3 et 6) que dans celui d'IL3000, ont été analysés en spectrométrie de masse et ont abouti à 6 identifications, dont 2 identiques. Les protéines identifiées sont : glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD+), glycosomal (Kohl *et al.*, 1996), p69 antigen (Boulangé & Authié, 1994), glycerol kinase (Q75T26), glycosomal glyceraldehyde (El Sayed *et al.*, 2005).

Parmi les protéines plus exprimées chez IL3000 (classes 1, 2, 5) on trouve : calmodulin (Wong *et al.*, 1992), calreticulin precursor (Q967S4), cystein protease precursor (Q26895), tubulin alpha & beta chain (Kimmel *et al.*, 1985), glycerol kinase (Q75T26), P69 antigen (Boulangé & Authié, 1994), glycosomal glyceraldehyde (El Sayed *et al.*, 2005).

La figure 26 présente une carte de la répartition des protéines identifiées et de leur classe d'appartenance sur la carte représentative des protéomes d'IL1180 et d'IL3000.

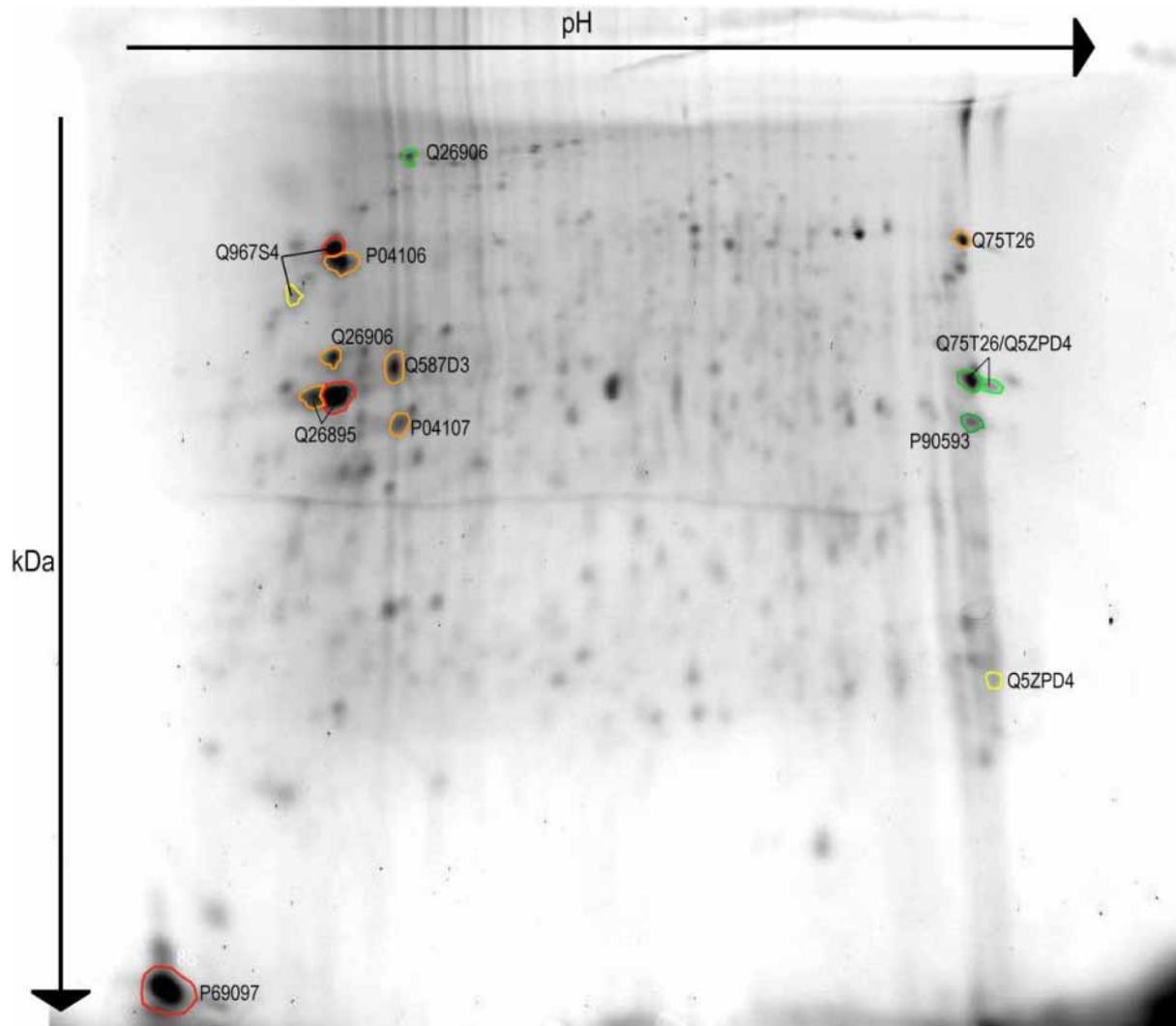


Figure 26. Protéines identifiées dans les protéomes d'IL1180 et d'IL3000 et reportées sur une image de gel DIGE des protéomes. Le code couleur est identique à celui du tableau VII.

La présence d'un certain nombre de chapelets de même poids moléculaire répondant à une même identification (Q26895, Q75T26/Q5ZPD4), correspond à des isoformes présentant des degrés de phosphorylation différents. La présence d'identifications identiques mais de masses moléculaires différentes (Q26906, Q5ZPD4) correspond à des isoformes de glycosylation, ou à un clivage protéolytique, une maturation ou une dégradation.

3.6 Comparaison sécrétome-protéome : validation de l'analyse du sécrétome

La présence dans les sécrétomes de produits éventuellement issus de la lyse des trypanosomes doit nous faire envisager la contamination des sécrétomes par du protéome. L'absence de produits caractéristiques du protéome dans le sécrétome serait la preuve de la qualité de celui-ci. Au total, 45 protéines ont été identifiées dans les sécrétomes et les protéomes. Nous avons comparé ces deux listes et cinq spots ont le même identifiant dans le sécrétome et dans le protéome.

Nous avons comparé, dans les gels bidimensionnels, les positions relatives de ces cinq identifications communes aux deux types d'échantillons (Tableau VIII).

Tableau VIII. Groupes de protéines identifiées extraites du sécrétome et du protéome des 2 clones parasitaires de *T. congolense* et ayant une caractérisation identique.

Groupe	N° DIGE	Classe	Masse	Pi	Score	% cover	Peptid match	Identification
1	S39	1	47488	5,07	102	23		Q967S4/Q967S4_TRYCO Calreticulin precursor
	S25	1	47488	5,07	102	23		
	S274	4	47488	5,07	120	26		
	P754	1	47488	5,07	129	28		
	P328	5	47488	5,07	78	15		
2	S29	1	50413	4,72	214		7	P04107 TBB_TRYBR Tubulin beta chain
	P444	2	50413	4,72	105	25		
3	S29	1	50383	4,93	88		1	P04106/TBA_TRYBR Tubulin alpha chain
	P740	2	50383	4,93	180	43		
4	S538	4	48981	6,47	56	10		Q26895/Q26895_TRYCO Cystein protease precursor
	P756 A	1	48981	6,47	46	15		
	P1021	2	48981	6,47	46	13		
5	S1193	4	48205	7,83	123		3	Q5ZPD4 Q5ZPD4_TRYCO Glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase
	S1479	2	34799	5,3	118		4	
	S717	3	34799	8,92	98	33		
	P1106	5	34799	8,92	58	25		
	P125	3	34799	8,92	58	25		
	P94	6	34799	8,92	58	25		

La comparaison dans les cartes bidimensionnelles du sécrétome et du protéome des positions relatives des 5 protéines a été réalisée sans expérimentation spécifique.

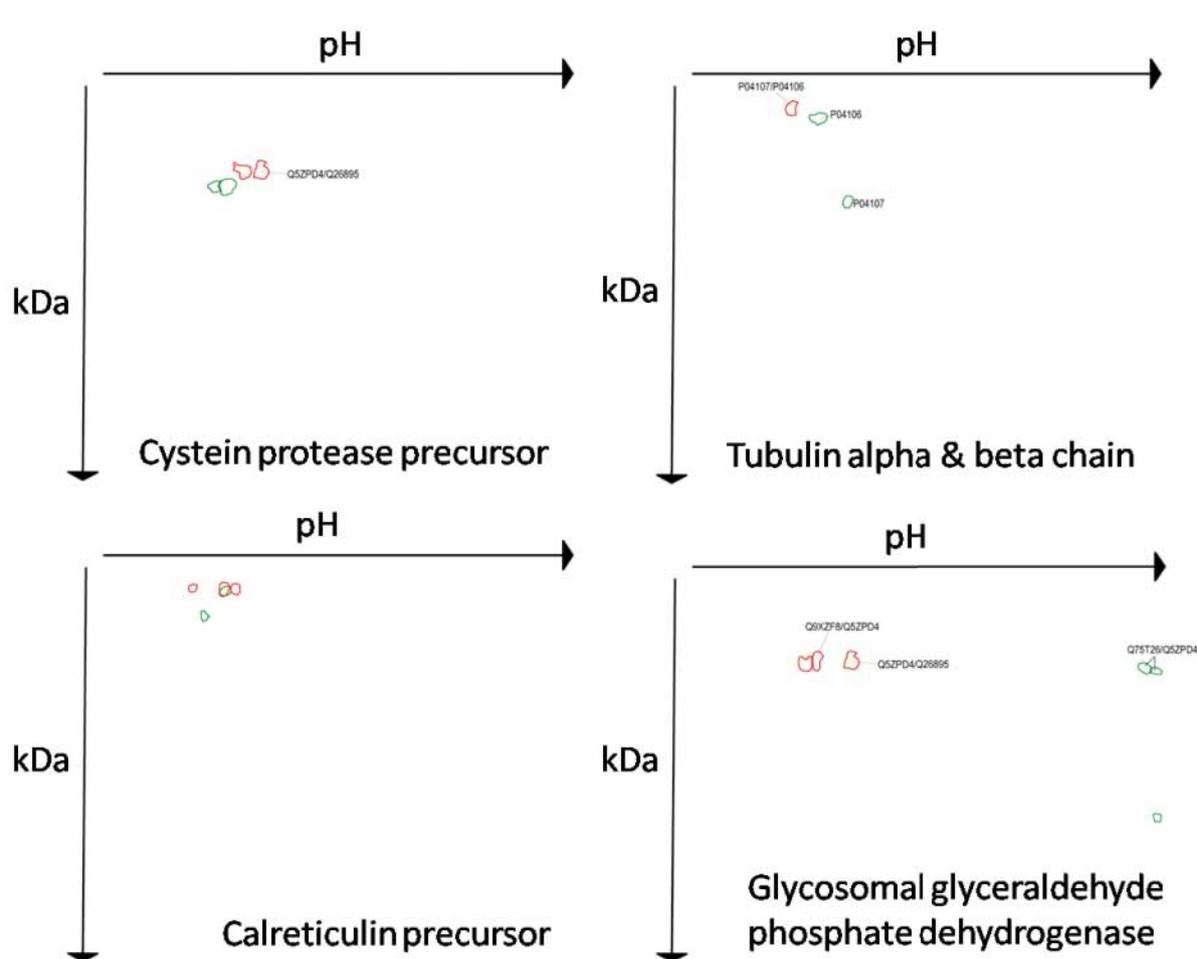


Figure 27. Carte de la distribution 2-D par groupe des protéines identifiées et caractérisées, communes au sécrétome et au protéome des 2 clones parasitaires. En rouge, les protéines du sécrétome ; en vert, les protéines du protéome.

L'examen de la Figure 27 nous montre que :

- Sur l'alignement du groupe cysteine protease precursor, les spots semblent présenter des poids moléculaires et des points isoélectriques différents selon leur appartenance au sécrétome ou au protéome. Cet alignement semble critiquable, une simple translation permettrait une superposition des spots. Cependant, l'analyse des autres groupes interdit cette translation.

- Les groupes tubulin alpha et beta chain sont caractérisés par des poids moléculaires et des points isoélectriques différents entre protéome et sécrétome. Les chaînes alpha et bêta de la tubuline sont distinctes l'une de l'autre dans le protéome (différence de poids moléculaire et de pH). Dans le sécrétome, les chaînes alpha et bêta de la tubuline ont été caractérisées dans le même spot. On pourrait à nouveau critiquer l'alignement en proposant de superposer les 2 spots de haut poids

moléculaire. Pour ce faire, il faudrait réaliser une translation de la carte du sécrétome vers les plus petits poids moléculaires et vers les pH alcalins. Cette translation irait à l'encontre de la translation hypothétique précédente et ne peut donc être considérée. Au niveau du sécrétome, la tubuline apparaît donc comme ayant un poids moléculaire plus important et à pHi plus acide.

- Le groupe calreticulin présente dans le sécrétome un chapelet d'isoformes avec des degrés de phosphorylations différents mais de même poids moléculaire. Les molécules caractérisées dans le protéome sont de poids moléculaires et de pH isoélectriques différents. Cependant, une seule molécule se superpose entre protéome et sécrétome (spots S39 et P754).

- Dans le groupe glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase on observe 3 isoformes de pH isoélectrique différents et de même poids moléculaires dans les sécrétomes. Dans le protéome on retrouve 3 formes dont 2 ont le même poids moléculaires que les formes retrouvées dans le sécrétome, avec cependant des pHi différents. La 3^e forme a un poids moléculaire est une forme de faible poids moléculaire.

Nous constatons qu'en dépit de la même identification de certaines protéines celles-ci migrent à des poids moléculaires et des pH isoélectriques différents selon qu'elles appartiennent au sécrétome ou au protéome. Ce qui sous-tend des comportements moléculaires différents. Ces observations renforcent encore la validité et la spécificité des sécrétomes.

3.7 Comparaison des deux clones parasitaires au travers de leur sécrétome

L'ensemble des spots des sécrétomes d'IL1180 et d'IL3000 ont été quantifiés. Nous avons comparé les spots des deux clones parasitaires.

- Parmi les 820 spots individualisés, 723 spots présentent le même niveau d'expression quelque soit la souche considérée.
- Parmi les 37 protéines identifiées et impliquées dans le différentiel d'expression, 3 molécules sont à la fois surexprimées chez IL1180 et IL3000. Elles possèdent la même identification mais présentent des isoformes différentes (Figure 28).

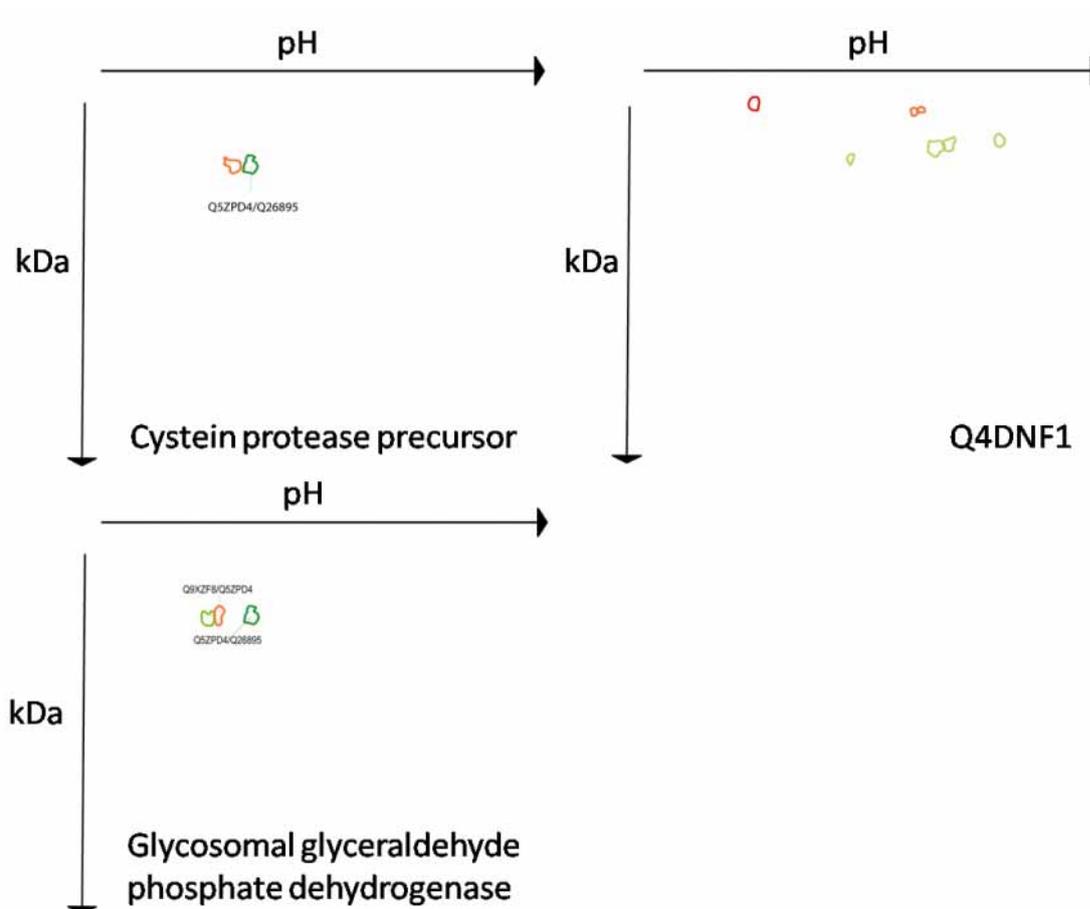


Figure 28. Cartes de la distribution 2-D des protéines ayant la même identification mais différemment exprimées dans les sécrétomes des 2 clones parasites. En vert, les protéines du sécrétome d'IL1180 ; en rouge, les protéines du sécrétome d'IL3000.

Aucune ambiguïté sur la position des spots ne peut être envisagée, les 2 types d'échantillons ayant été déposés simultanément sur le même gel. L'observation de la Figure 28 nous montre que :

- Les 17 protéines identifiées et impliquées dans le différentiel d'expression sont spécifiques de la virulence et/ou de la pathogénicité des 2 clones.
- les protéines à l'identification commune (cystein protease precursor et glycosomal glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) se différencient par des degrés de phosphorylation différents selon de leur origine parasite. Le cas de Q4DNF1 (putative uncharacterized) montre que ces isoformes peuvent en plus être de poids moléculaires différents selon qu'elles proviennent du sécrétome d'IL1180 ou de celui d'IL3000.

- Les protéines associées à une virulence et/ou à une pathogénicité plus faibles sont : 2,3-biphosphoglycérate-independent phosphoglycerate mutase, glycosomal T-complex protein 1, theta subunit, eukaryotic translation initiation factor 3 subunit, activated protein kinase C receptor homolog, enolase (Q4DZ98), adenosylhomocysteinase, aminopeptidase, variable surface glycoprotein precursor.
- Les protéines associées à une virulence et/ou à une pathogénicité accrues sont : calreticulin precursor, tubulin beta & alpha chain, vacuolar ATP synthase subunit B, cystein protease, elongation factor 2, enolase (Q9NDH8), NADPH-dependent FMN/FAD containing oxydoreductase, Arginine kinase.

Selon la virulence et la pathogénicité des souches, 17 protéines spécifiques de clone et trois protéines ayant la même identification chez les deux clones, mais présentant des isoformes différentes, sont proposées pour la première fois comme marqueurs de virulence et/ou de pathogénicité de *T. congolense* et peuvent être évaluées en tant qu'outils de diagnostic.

Nous avons mis en évidence :

1. Une différence de profil en gel bidimensionnel entre d'une part les sécrétomes et d'autre part les protéomes de nos deux souches de *T. congolense*
2. Une différence d'expression au niveau des sécrétomes et des protéomes entre chacun des deux clones parasite.

Au même titre que l'expression différentielle a constitué un filtre analytique qui nous a permis d'identifier des marqueurs potentiels d'infectiosité, la reconnaissance différentielle par des sérums de bovins infectés peut-elle constituer un second filtre analytique pour la validation de ces marqueurs ?

3.8 Immuno-empreintes différentielles des sécrétomes et des protéomes

Nous avons réalisé une étude préliminaire en utilisant des sérums de bovins trypanosensibles et trypanotolérants sur des protéines des sécrétomes et des protéomes, séparées par électrophorèse 1-D ou 2-D et transférées sur membrane.

Disposant de quantités plus importantes de sécrétome et de protéome d'IL3000, les immuno-empreintes 1-D et 2-D ont été réalisées uniquement avec des extraits de ce clone parasitaire (Figures 29 et 30).

En utilisant des sérums immuns de bovins trypanosensibles (zébus) et trypanotolérants (N'Dama) nous avons cherché à :

- Déterminer si les sérums étaient capables de reconnaître des molécules différentes, au niveau du sécrétome et au niveau du protéome de *T. congolense*.
- Déterminer si les sérums de bovins trypanosensibles et de bovins trypanotolérants ont une réponse différente aux protéines des deux clones parasitaires.

3.8.1 Immuno-empreintes 1-D du sécrétome et du protéome d'IL3000

On peut observer la faible réactivité des sérums sur le sécrétome. Cependant, la présence de bandes sur les immuno-empreintes obtenues à partir du protéome, valide l'immuno-réactivité des sérums (Figure 29).

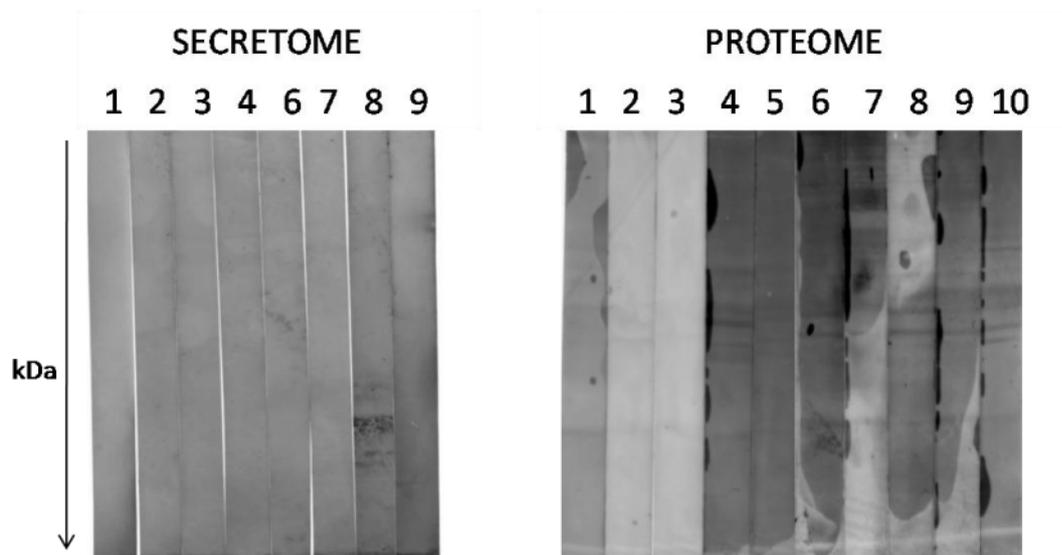


Figure 29. Immuno-empreintes 1-D de sérums de bovins trypanotolérants (1, 2, 3, 4, 5) et trypanosensibles (6, 7, 8, 9, 10) du sécrétome et du protéome d'IL3000.

Ces expériences préliminaires n'avaient pour objectif que de valider l'immuno-réactivité des sérums (Figure 29). La présence d'un signal sur l'immuno-empreinte 1-D du protéome nous permet d'envisager une analyse différentielle de la réactivité des sérums de bovins trypanosensibles et trypanotolérants sur le protéome d'IL3000 en 2-D.

3.8.2 Immuno-empreintes 2-D du protéome d'IL3000

La figure 30 présente les immuno-empreintes de sérums de bovins trypanosensibles (TS716 et TS721) et trypanotolérants (TTND3 et TTND5) sur le protéome d'IL3000.

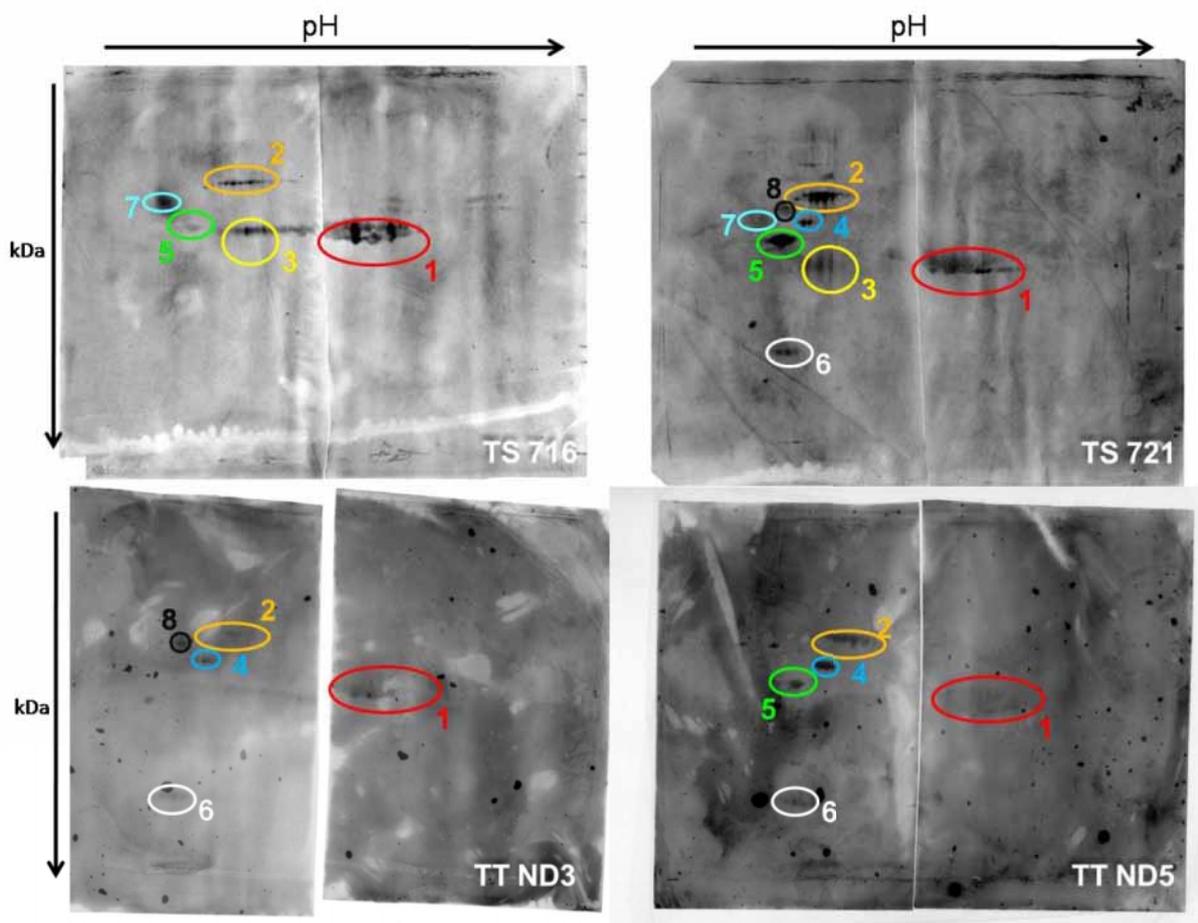


Figure 30. Immuno-empreintes 2-D du protéome d'IL3000 révélées par des sérums de bovins trypanosensibles (TS 716, TS 721) et trypanotolérants (TTND3, TTND5). Les immuno-empreintes les plus importantes sont numérotées de 1 à 7.

L'observation de la Figure 30 permet plusieurs constats :

- Une variabilité individuelle apparaît entre les protéines reconnues par les sérums des animaux de chaque groupe :
 - Chez les trypanosensibles : empreintes 4, 6 et 8 ;
 - Chez les trypanotolérants : empreinte 8.
- Malgré les variabilités individuelles observées, on note une réponse spécifique inhérente au statut trypanosensible ou trypanotolérant des bovins, au travers des empreintes 3 et 7, et dans une moindre mesure de l’empreinte 1.

Ces empreintes représentent des candidats particulièrement intéressants en tant que marqueurs potentiels de sensibilité à l’infection trypanosomienne.

Ces résultats, bien que préliminaires, montrent que la reconnaissance différentielle par des sérums de bovins infectés, trypanosensibles et trypanotolérants, peut constituer un second filtre analytique pour la validation des marqueurs d’infectiosité issus de l’analyse de l’expression différentielle des sécrétomes et des protéomes des deux clones de *T. congolense*.

CHAPITRE IV. DISCUSSION

La particularité de la situation extracellulaire du trypanosome fait du sécrétome le premier élément du dialogue avec l'hôte. La réponse de ce dernier intervient après le 1^e pic parasitémique et se traduit par la destruction des trypanosomes ; c'est au niveau du protéome du parasite que va s'élaborer la seconde phase du dialogue, où le parasite se doit de trouver une réponse adaptée pour sa survie et sa multiplication. Nous avons choisi d'étudier les compartiments protéiques de la 1^e phrase du dialogue moléculaire entre le parasite et son hôte, avant la mise en place d'une réponse de l'hôte à l'infection parasitaire.

Les travaux de recherche exposés dans ce mémoire ont donc porté sur l'étude protéomique des facteurs excrétés/sécrétés (sécrétome) au cours des infections à *T. congolense*.

Nous avons identifié, pour la première fois, les composants du compartiment protéique qu'est le sécrétome de *T. congolense*. Cette caractérisation moléculaire apporte de nouveaux éléments pour la compréhension des processus infectieux induits par les trypanosomes et ouvre des voies nouvelles dans l'amélioration de la lutte contre les trypanosomoses à *T. congolense*.

Cette étude présente un intérêt scientifique à double titre : l'originalité de la méthode utilisée et l'amélioration des connaissances sur la virulence et la pathogénicité de *T. congolense*. L'identification de molécules d'intérêt pour le diagnostic, la chimiothérapie ou l'immunoprotection constitue une avancée majeure pour la surveillance sanitaire et le développement de l'élevage bovin en Afrique.

La méthode que nous avons suivie part d'abord de l'observation de comportements biologiques au cours de l'infection à *T. congolense* chez le bovin. Elle nous a permis de dégager deux modèles parasitaires représentatifs : l'un peu virulent et peu pathogène représenté par le clone IL1180 et l'autre virulent et hautement pathogène représenté par le clone IL3000. Nous avons ensuite observé ces comportements biologiques chez des rongeurs de laboratoire et validé l'utilisation ce modèle pour la production standardisée du matériel biologique : les protéines excrétées/sécrétées (PES ou sécrétome) et constitutives de l'agent pathogène.

La caractérisation moléculaire des protéines du sécrétome a été réalisée en suivant deux approches. La première a consisté en une analyse systématique, elle nous a permis d'établir un

catalogue exhaustif des protéines du sécrétome. Cette analyse a été suivie par une approche comparative qui nous a permis d'une part, de valider la qualité de nos sécrétomes, et d'autre part, d'identifier de nouveaux marqueurs de virulence et de pathogénicité de *T. congolense*.

4.1 Développement d'une méthode standardisée pour l'étude des protéines excrétées/sécrétées et constitutives de *T. congolense*

Le développement d'une méthode standardisée visait à rendre notre approche expérimentale portable, reproductible et fiable. Ces critères de qualité devaient favoriser à la fois un minimum de variabilité technique lors des expérimentations et un maximum d'expression de la variabilité biologique.

4.1.1 Importance d'un échantillonnage standardisé

Le premier aspect remarquable de la méthode suivie a résidé dans le transfert d'un modèle d'infection expérimentale de l'hôte naturel vers des animaux de laboratoire, où les comportements biologiques des deux clones parasites se sont avérés être reproductibles. Le choix de ce transfert de modèle était incontournable pour des raisons pratiques, économiques et éthiques.

En dépit des changements d'espèce de l'hôte (bovins, souris Balb/c, rats NUDE), nos deux clones ont toujours conservé des comportements et des propriétés infectieuses similaires d'un hôte à l'autre, nous permettant de confirmer l'homogénéité, la reproductibilité et la fiabilité du modèle d'étude.

Le choix de rats congéniques, SOPF et NUDE, offre un milieu neutre, capable de lisser la variabilité individuelle de la réponse déjà observée chez les rongeurs (Irfan, 1968 ; Jennings *et al.* 1978) et favorise l'expression différenciée des deux souches parasites. Ces animaux de laboratoire ont donc été utilisés pour amplifier les populations de trypanosomes utilisées pour les sécrétions.

Le tampon de sécrétion a été adapté de celui utilisé par Holzmüller *et al.* (2008) avec *T. b. gambiense*. L'usage d'un milieu axénique sans sérum de veau fœtal, a permis d'éviter un apport de protéines non liées au parasite, ce qui aurait ajouté une contrainte supplémentaire à notre étude. Les conditions stériles qui ont accompagné la production *in vivo*, la récolte et les sécrétions, ont interdit toute source de contamination protéique autre que celle du parasite.

Par ailleurs, afin de s'assurer que les PES ne sont pas contaminées par d'éventuels produits de lyse parasitaire au cours de la sécrétion, nous avons mis en place le suivi de viabilité et du dénombrement des cellules parasitaires au moyen de la cytométrie de flux. Ce suivi a permis de sélectionner les populations de parasites avec un niveau de viabilité nettement supérieur au seuil minimum de 97%.

Notre méthode standardisée nous a permis de produire, chez l'animal de laboratoire, les compartiments constitutifs et excrétés/sécrétés de *T. congolense*, dans de bonnes conditions de reproductibilité et de fiabilité.

4.1.2 Intérêts d'une approche protéomique diversifiée

Après l'engouement pour la protéomique dans les années 1990, Biron *et al.* (2006) ont avancé plusieurs arguments pouvant nuancer les résultats des études 2-D : faiblesse des méthodologies, absence de validation statistique, taux élevé de faux positifs et biais de l'identification établie sur la base d'une homologie apparente.

Pour neutraliser les imperfections dues à la polymérisation des gels et à la migration, nous avons utilisé le logiciel SameSpots. Ce logiciel est capable d'analyser plusieurs gels 2D en incluant une filtration des images, de détecter automatiquement les spots, de normaliser leur volume et de procéder aux analyses statistiques. Il nous a permis de procéder de façon optimisée aux alignements et à la comparaison des gels. Une grande partie des protéines impliquées dans le différentiel d'expression entre les deux clones ont été caractérisées en MALDI-TOF. Les difficultés de caractérisation en MALDI-TOF peuvent être liées à la complexité de certains des agrégats. Une analyse complémentaire en Q-TOF nous a permis de surmonter ce problème.

L'analyse en Q-TOF est particulièrement précise et sensible, mais l'identification des protéines est dépendante des caractérisations existantes dans les bases de données. En effet, le nombre de protéines identifiées pour *Trypanosoma* dans les banques est limité à 246 protéines dans SwissProt contre 30682 séquences protéiques actuellement pour *Trypanosoma* dans TrEMBL. Dans cette banque de données, 20605 séquences portent sur *T. cruzi*, 9945 sur *T. brucei* et seulement 65 sur *T. congolense*. Le fait que l'identification ait été établie uniquement sur la base d'homologie de séquences proposées dans les banques de données génomiques de *T. brucei* et *T. cruzi*, nous pousse à nuancer les résultats de spectrométrie de masse des bandes 1D. La mise à jour continue de ces données est nécessaire pour pouvoir caractériser les protéines hypothétiques ou non

caractérisées, notamment par la recherche d'homologies dans les bases de données sur *T. congolense*.

Une limite de notre étude a résidé dans la faible production de PES par les parasites. Après vérification de la bonne reproductibilité, qui nous a permis de regrouper les échantillons par clone parasitaire, nous avons obtenu un nombre suffisant d'électrophorèses.

L'approche protéomique que nous avons choisie pour cette étude a été développée suivant deux axes:

- L'établissement d'un catalogue exhaustif des protéines du sécrétome de *T. congolense* pour la définition de nouveaux candidats diagnostics thérapeutiques et vaccinaux. L'identification d'un total de 181 protéines n'a fait que renforcer la complexité du sécrétome sans que soient mis en évidence les marqueurs associés à l'infectiosité de *T. congolense*. Désireux d'aller plus en avant dans l'identification des protéines les plus impliquées dans l'infectiosité, il nous est apparu nécessaire d'ajouter à notre démarche une analyse comparative du comportement biologique des deux clones en gel bidimensionnel (2-D DIGE).
- La réalisation, à partir de gels 2-D, d'une analyse comparative à plusieurs niveaux :
 - La comparaison des compartiments protéiques des deux clones parasites afin de valider l'absence de contamination du sécrétome par le protéome ;
 - La comparaison des sécrétomes des clones parasites pour identifier et caractériser au niveau moléculaire de nouveaux marqueurs de virulence et de pathogénicité ;
 - La comparaison des molécules du sécrétome ayant la même identification chez chacun des clones.
 - La comparaison de la réponse sérologique de bovins trypanosensibles et de bovins trypanotolérants au sécrétome et au protéome du clone le plus virulent et le plus pathogène.

4.2 IL1180 et IL3000 : deux clones, deux comportements biologiques

Le critère de virulence choisi a été le dénombrement des trypanosomes dans le sang de l'hôte. La cinétique parasitaire traduit la capacité du parasite à se multiplier.

On a observé, dans les 2 lots de bovins infectés, une cinétique d'apparition des parasites identique. Dès la 1^e vague parasitémique, IL3000 a atteint son pic maximum, douze fois et demi plus important que celui d'IL1180, atteint après plusieurs vagues. Ce phénomène a également été observé chez les rongeurs où IL3000 atteint un pic maximum, deux fois plus important que celui d'IL1180, beaucoup plus tardif. Cela s'est traduit par des taux de production très différents entre les deux clones. Le clone IL3000 a constitué de fait notre modèle de virulence.

L'évaluation de la pathogénicité des 2 clones chez les bovins et les rongeurs s'est d'abord appuyée sur la mesure du taux d'hématocrite, qui indique une anémie, principal caractéristique des infections à *T. congolense*.

Le taux moyen d'hématocrite des bovins infectés par IL1180 a chuté dès la première période qui a précédé l'apparition des premiers parasites ; il restera inférieur à celui du lot témoin pendant toute la durée de l'expérimentation. IL1180 n'a atteint son pic parasitémique maximum que tardivement, ce qui a contribué à maintenir un état d'anémie permanent. Avec IL3000, l'anémie n'a été observée qu'à partir du premier pic parasitémique et a perduré jusqu'à la fin de l'expérimentation. On a néanmoins observé en fin de période une remontée du taux d'hématocrite, ce qui correspond à la quasi disparition de la charge parasitaire. Chez les 2 lots de rongeurs infectés, on assiste à une chute rapide du taux d'hématocrite dans les jours qui suivent l'infection. Ces observations confirment l'étroite relation existant entre charge parasitaire et anémie, déjà été observée par Van den Bossche *et al* (2001) au cours d'infections expérimentales.

La mesure du taux de survie chez les rongeurs et du taux de leucocytes chez les bovins, sont les autres indicateurs retenus.

Chez les rats, un taux de survie de 80% pour le lot infecté avec IL1180 et une mortalité rapide et totale pour le lot infecté avec IL3000, confirment aussi le caractère hautement pathogène de ce clone.

Le taux de leucocytes des bovins infectés avec IL1180 ne s'est jamais différencié de celui du lot témoin. Par contre, la chute brutale des taux moyens de leucocytes chez les bovins infectés avec

IL3000 est intervenue peu avant l'observation des premiers parasites et perdurera jusqu'à la fin de l'expérience. Cette observation caractérise une immunomodulation précoce chez l'hôte infecté avec IL3000, et renforce notre hypothèse de facteurs produits précocement par le parasite dans la stratégie invasive.

L'analyse de ces taux sur l'ensemble de la période post-infection ne laissant apparaître que peu de différences entre les comportements des deux clones, nous avons choisi de l'accroître la sensibilité de l'analyse en la reportant sur plusieurs périodes après infection. L'observation des indicateurs de virulence et de pathogénicité par périodes nous permet de dégager deux comportements et stratégies différents selon les clones : peu invasive avec une anémie marquée chez les bovins infectés avec IL1180 ; virulente, avec une anémie marquée et un taux de leucocytes fortement diminué chez les bovins infectés par IL3000.

4.3 Caractérisation moléculaire des protéines excrétées/sécrétées et constitutives de *T. congolense*

C'est sur la base de ces différences de comportements biologiques que nous avons réalisé l'analyse des différentiels d'expression des protéines excrétées/sécrétées et constitutives de *T. congolense*.

4.3.1 Validation du sécrétome par l'analyse du protéome

Si nous avons réalisé l'étude du protéome de *T. congolense* parallèlement à l'étude de son sécrétome, c'est qu'il nous a paru incontournable de valider la qualité des produits excrétés / sécrétés, exempts de toute contamination protéique par le protéome.

Le contrôle réalisé en cytométrie de flux nous avait déjà indiqué qu'au cours des sécrétions le nombre de parasites viables était très nettement supérieur au seuil de 97% qui tenait compte du bruit de fond rencontré au cours de l'analyse. Cela signifie que nous n'avons toléré au maximum 2% de pollution par la lyse parasitaire.

Pour comparer protéome et sécrétome, nous n'avons pas encore réalisé d'alignement expérimental de 2-D DIGE. Nous avons choisi de prendre comme objets d'analyse les molécules ayant la même identification, à la fois dans le sécrétome et dans le protéome, et de comparer leurs positions relatives.

Dix-huit spots sont répartis dans les 5 groupes correspondant aux identifications protéiques communes des deux échantillons. La translation d'un seul de ces groupes de spots aurait pu aboutir à une superposition et nous permettre d'émettre l'hypothèse que ces spots correspondent aux mêmes isoformes dans le sécrétome et dans le protéome. Mais cette translation serait incompatible avec d'éventuelles superpositions au sein des autres groupes. Dans ces derniers, les identifications communes se reportent toutes à des isoformes différentes ou correspondent, selon le type d'échantillon, à des formes protéiques de poids moléculaires différents qui traduisent des états de maturation différents (clivage protéique, degrés de glycosylation).

Ces observations nous permettent d'avancer que les échantillons de sécrétome que nous avons utilisés dans le cadre de cette étude sont exempts de contamination par les protéines du protéome. La spécificité des protéines composant le sécrétome, fait de ce dernier un compartiment biologique à part entière. La finalité de l'existence de ce compartiment extracellulaire du trypanosome ne trouve son sens qu'en tant que partie prenante dans la stratégie invasive du parasite, notamment au cours la première phrase du dialogue avec l'hôte.

4.3.2 Protéines d'intérêt issues de l'approche exhaustive

Répondant aux objectifs affichés du WorkPackage 6 du projet européen de Coopération Internationale - Développement (INCO-DEV) « Development of an anti-disease vaccine and diagnostic tests for African trypanosomosis » (TRYPADVAC2), qui visait à l'établissement d'un catalogue exhaustif des protéines d'intérêt diagnostique, thérapeutique et vaccinal de *T. congolense*, nous avons réalisé un premier inventaire par l'analyse en spectrométrie de masse des échantillons provenant du mélange des sécrétomes des deux clones.

Ce criblage a permis, pour la première fois, de mettre en évidence la diversité, la complexité et l'identité des protéines composant le sécrétome de *T. congolense*. Durant cette étape, quarante bandes ont été analysées en spectrométrie de masse, parmi elles une seule (bande 4) n'a pas pu être associée à des séquences connues de protéines de *T. brucei* et de *T. cruzi*. Le contenu protéique de cette bande présente probablement des propriétés chimiques incompatibles avec les protocoles de spectrométrie de masse et devra être retravaillé. Néanmoins, ce sont au total 181 protéines qui ont été identifiées de façon non redondante. Lorsqu'on compare ce nombre aux centaines de spots protéiques exprimés dans les gels d'électrophorèse 2-D, dont on sait qu'ils sont constitués par un

grand nombre d'isoformes et de formes à des états de maturation différents, ce nombre de protéines identifiées nous paraît cohérent.

Pour essayer de comprendre l'intérêt d'une telle diversification des protéines du sécrétome, nous avons réalisé une recherche dans les bases de données de leurs fonctions cellulaires. La classification de plusieurs protéines en domaines impliquées dans le métabolisme cellulaire ou la synthèse protéique, nous interpelle sur l'utilité de tels composants dans le sécrétome et soulève à ce titre la question de l'adéquation des domaines fonctionnels cellulaires de référence avec une classification des PES.

Par contre, que 59% des protéines identifiées du sécrétome ne soient pas associées à des fonctions connues dans Gene Ontology nous semble cohérent avec le fait que les référentiels disponibles sont basés sur les fonctions des protéines dans la cellule et de ce fait, peu adaptés aux fonctions des protéines excrétées / sécrétées. De plus, la classification des protéines du sécrétome par association aux fonctions cellulaires de référence de Gene Ontology met en évidence une relation entre les protéines du sécrétome et les facteurs de croissance, la réponse immune, la réponse au stress, le transport, les hormones et la traduction des signaux, qui sont autant de fonctions compatibles avec le statut de médiateurs solubles des protéines du sécrétome. Le fait que 7% des fonctions des protéines du sécrétome soit référencées en tant qu'immunomodulateurs nous confirme une implication du sécrétome dans la stratégie infectieuse du trypanosome.

Malgré grand nombre d'identifications, qui fait du sécrétome un produit complexe, nous pouvons pointer 28 d'entre elles, connues pour leur intérêt médical : 17 constituent des cibles thérapeutiques potentielles, 9 ont été décrites dans la littérature pour leurs propriétés immunoprotectrices et 3 sont identifiées comme facteur de pathogénicité et de virulence dans les infections à trypanosomes et notamment la cyclophiline de type A, déjà classée parmi les protéines à potentiel immuno-protecteur chez *T. congolense*. Ces 28 protéines identifiées et caractérisées sont autant de candidates de 1^e intention pour des études permettant de les valider en tant que marqueurs diagnostic, cibles thérapeutiques ou vaccinales de *T. congolense*. A ces 28 protéines s'ajoutent 105 autres qui ont été identifiées et caractérisées, mais jamais décrites en tant que facteurs de virulence et de pathogénicité. Des collaborations sont envisagées pour pouvoir mesurer l'importance des ces molécules dans l'infectiosité.

Chez *T. congolense* en particulier, Delespaux *et al.* (2005) ont mis en évidence le rôle du transporteur ABC dans la résistance au traitement à l'isométabidum. Nok (2002), en utilisant un

extrait éthanolique capable d'inhiber l'activité de la glycérol phosphate déshydrogénase glycosomale, a réussi à bloquer la respiration cellulaire glucose-dépendante de *T. congolense*, stoppant ainsi la croissance de formes sanguicoles. Pellé et ses collaborateurs (2002) ont localisé la cyclophiline de type A (CypA) dans le cytosol et le flagelle de *T. congolense*, mais aussi dans les produits solubles sécrétés par le trypanosome. De plus, il s'est avéré que les antisérums de bovins immunisés avec des fractions de trypanosomes réagissent fortement contre CypA, ce qui fait de cette protéine un immunomodulateur puissant. Seul marqueur caractéristique du sécrétome de *T. congolense*, CypA confirme la pertinence de l'étude du sécrétome et constitue un marqueur très intéressant de la virulence et de la pathogénicité de notre modèle.

Cette première étape de l'approche protéomique diversifiée nous a permis de dresser l'état des lieux du sécrétome de *T. congolense*. La qualité du produit analysé, d'où est absent toute contamination protéique en provenance du protéome, nous laisse à penser que nous avons affaire à un compartiment spécialisé du parasite, voué à l'initiation de sa stratégie invasive. Le fait qu'à partir d'un compartiment du trypanosome, nous ayons pu observer deux comportements biologiques très différents, nous a poussés à aller vers une identification précise des protéines d'intérêt. La complexité de la composition protéique du sécrétome révélée par une première démarche exhaustive, nous a confortés dans le choix de l'analyse comparative du différentiel d'expression entre les deux clones pour aller plus loin dans l'identification des marqueurs d'infectiosité et mieux comprendre le rôle du sécrétome dans la stratégie parasitaire.

4.3.3 Protéines d'intérêt issues de l'approche différentielle

L'approche différentielle s'est appuyée sur une sélection de protéines déterminée par l'importance de la différence d'expression entre les deux clones parasitaires. L'alignement des spots des gels DIGE des sécrétomes de chaque clone et celui de leurs protéomes, a permis la définition de classes représentatives du niveau d'expression protéique des deux clones. Au sein de ces groupes, plusieurs protéines présentant un fort différentiel d'expression ont été identifiées.

4.3.2.1 Un protéome dédié à la production d'énergie et à la prolifération

L'analyse du différentiel d'expression entre les protéines des protéomes de chacun des deux clones a mis en évidence 66 protéines impliquées dans les classes des différentiels d'expression les plus importants. Parmi elles, 17 protéines ont été identifiées, qui nous permettent de mieux comprendre l'orientation de l'activité du protéome chez les trypanosomes.

Glycérol kinase, glycéraldéhyde phosphodéshydrogénase glycosomale (GAPDH) et antigène P69 sont les protéines identifiées dans les protéomes des deux clones parasites. Glycérol kinase et GAPDH ont été déjà été identifiées chez *T. brucei* et sont connues en tant qu'acteurs de la glycolyse (Vertommen *et al.*, 2008). Au sein du glycosome, le NAD⁺ (Nicotinamide Adénine Dinucléotide, coenzyme d'oxydoréduction) est réduit par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, puis est ré-oxdé durant la transformation du phosphate dihydroxyacétone en glycérol 3-phosphate, produit principal du métabolisme du glucose dans le glycosome, qui est ensuite transformé en pyruvate dans le cytosol, en aval de la chaîne métabolique. Le maintien de l'équilibre ATP/ADP passe par la transformation du glycérol 3-phosphate excédentaire en glycérol par la glycérol kinase (Clayton et Michels, 1996).

L'antigène P69 (Boulangé et Authié, 1994) présente une grande homologie avec les protéines BiP (immunoglobulin heavy chain binding protein) des mammifères qui se caractérise par une localisation dans le RE, un rôle de chaperonne et la présence d'une séquence signal hydrophobe situé à l'extrémité N-terminale et d'un térapeptide (X) DEL à l'extrémité C-terminale. La divergence entre P69 et les autres BiPs se situe au niveau de cette extrémité C-terminale, que l'on suspecte d'être responsable du caractère hautement immunogène de la protéine.

La surexpression de protéines du glycosome apparaît comme l'indicateur d'une activité métabolique générale du parasite orientée dans une stratégie de recyclage de l'oxygène et de production d'énergie. Par contre, α et β -tubuline, cystéine protéase (CP), calmoduline (CALM) et calréticuline (CRT), sont les protéines spécifiquement surexprimés dans le protéome d'IL3000.

La β -tubuline a déjà été identifiée comme cible vaccinale contre les infections à trypanosomes (Lubega *et al.*, 2002). Les microtubules des trypanosomes sont principalement composés de deux sous-unités structurales (α et β -tubuline), qui interagissent en association avec certaines protéines. La β -tubuline en particulier est une simple isoforme qui se retrouve sur le fuseau mitotique du noyau en division (Liu *et al.*, 2007), la surface membranaire, la tige paraflagellaire (« paraflagellar rod » ou PFR) et dans le flagelle. La polymérisation des microtubules constitue le point focal de leur fonction biologique ; c'est cette dynamique qui leur permet de s'adapter rapidement aux besoins de changements de conformation de la cellule.

La calmoduline est une molécule multifonctions qui est connue chez les eucaryotes pour sa capacité à se lier au Ca²⁺ et à convertir ses signaux dans la cellule. La calmoduline s'est avérée

posséder une isoforme spécifique des trypanosomes (Ruben *et al.*, 1983), qui pourrait en faire un marqueur diagnostique. La calmoduline n'est active qu'en association avec d'autres protéines (PFR-A et protéine C) et participe à l'activité du complexe de la PFR (Ridgley *et al.*, 2000).

Les cystéines protéases (CPs) sont des peptidases impliquées dans la protéolyse par un mécanisme catalytique. Ces protéines sont abondantes chez les trypanosomes et ont déjà été identifiées chez *T. congolense*, où elles génèrent une réponse à immunoglobulines G1 (IgG1) chez les bovins « trypanotolérants » (Authié *et al.*, 1992, 1993). L'inhibition des CPs chez *T. brucei* altère la morphologie et la prolifération du parasite chez les animaux infectés (Scory *et al.*, 2007), ce qui en fait des cibles thérapeutiques potentielles.

La calréticuline (CRT) est une protéine chaperonne de 46 kDa qui réside dans le réticulum endoplasmique (RE) de la plupart des eucaryotes, levures et érythrocytes exceptés (Michalak *et al.*, 1999). Son extrémité N-terminale est constituée d'une séquence signal d'acides aminés très conservée et son extrémité C-terminale par une séquence signal spécifique du RE, KDEL (Fliegel *et al.*, 1989). Cette molécule possède 3 domaines structuraux et fonctionnels bien distincts. Le domaine -N (résidus 1-180) sert à la liaison avec les métaux lourds (Zn^{2+}), et c'est aussi dans ce domaine que se font les interactions protéines-protéines avec les chaperonnes du RE (disulfide isomérase et ERP57) et les domaines de liaison de l'ADN. Le domaine-P (résidus 181-290) constitue une région riche en proline et se caractérise par une structure en forme de bras en extension. Ce domaine offre une très grande affinité avec le calcium (Ca^{2+}), une activité « lectine-like » et une importante similarité avec d'autres chaperonnes telles que la calnexine (Bergeron *et al.*, 1994). Le domaine C, situé dans l'extrémité C-terminale, est très acide et se termine avec la séquence KDEL. Il possède une très forte capacité de fixation du Ca^{2+} (jusqu'à 30 mol / mol de CRT). Cette capacité à fixer les ions calciques intervient dans la régulation des interactions avec d'autres protéines.

Chez les deux clones, l'activité métabolique est orientée vers la consommation d'oxygène et la production d'énergie, mais la surexpression de la calmoduline et des deux chaînes de la tubuline apparaît comme spécifique du protéome d'IL3000. Cette activité concerne en particulier le développement du flagelle, indispensable au déplacement, à la survie et à la prolifération du trypanosome dans le flux sanguin de son hôte.

4.3.2.2 Le sécrétome, à l'avant-garde de la stratégie infectieuse de *T. congolense* ?

Plusieurs protéines d'intérêts ont été mises en évidence à la suite de l'analyse comparative du différentiel d'expression entre les deux sécrétomes. Nous nous intéressons ici qu'aux protéines surexprimées dans le sécrétome d'IL3000, clone le plus virulent et le plus pathogène. Plusieurs protéines d'intérêt ont été identifiées dans ce sécrétome : les chaînes α et β de la tubuline, l'énolase, la cystéine protéase (CP), le facteur 2 d'élongation, l'ATP-synthase vacuolaire, l'arginine kinase et la FMN/FAD NADPH dépendante. La calréticuline (CRT), protéine la plus fortement exprimée chez IL3000, retiendra particulièrement notre attention.

Le fait que les séquences de l'énolase de *T. brucei* présentent 60% d'homologie avec l'énolase humaine, constituait un obstacle majeur à son usage en tant que cible thérapeutique. Giotto *et al.* (2003) ont mis en évidence trois résidus situés à proximité du site catalytique de l'énolase de *T. brucei*. Ces trois résidus possèdent un groupe chimique réactif qui pourrait jouer un rôle clé dans la conception d'un inhibiteur de l'énolase de trypanosomes.

Les trypanosomes africains sécrètent des CPs dans le sang de l'hôte, que l'on soupçonne de provoquer l'agrégation des plaquettes (Mottram *et al.*, 1998). La capacité du bovin trypanotolérant à produire une réponse spécifique aux CPs de type I, constitue une preuve du caractère pathogène de l'enzyme (Authié, 1994). Par ailleurs, chez *Leishmania* plusieurs travaux ont mis en évidence le caractère immunogène des CPs (Wolfram *et al.*, 1995 ; Soong *et al.*, 1995 ; Beyrodt *et al.*, 1997).

Chez *T. cruzi*, l'arginine kinase est une enzyme clé de la gestion de l'énergie dans la cellule. Il a été démontré que l'arginine kinase favorise l'adaptation du parasite à des conditions de stress nutritif (Pereira *et al.*, 2003) et oxydatif (Miranda *et al.*, 2006).

La modulation de l'hémostase calcique (Michalak *et al.*, 2002) et son activité chaperonne (Trombetta, 2003) sont les rôles les plus connus de la CRT ; celui d'immunomodulateur à l'extérieur du RE, notamment dans le cadre d'infections par des parasites extra cellulaires tel que *T. congolense*, n'a jamais été étudié.

Par contre, il a été observé que la CRT était essentielle dans l'assemblage des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe I, indispensable à la présentation des antigènes de classe I (Gao *et al.*, 2002). Elle peut aussi intervenir à la surface de la cellule en provoquant la phagocytose des cellules apoptotiques par association avec les collectines (Henson *et al.*, 2001) ou les C1q du complément (Kovacks *et al.*, 1998). Par ailleurs, elle est candidate pour le développement d'un test de diagnostic ELISA de *T. cruzi* (Marcelain *et al.*, 2000).

Néanmoins, la question de la voie permettant à la CRT de s'échapper du RE reste posée, même s'il semble s'agir d'isoformes dépourvues de signal de reconnaissance liant la CRT au RE (Johnson *et al.*, 2001), ou encore de CRT glycosylée sous l'influence du stress (Jethmalaani *et al.*, 1997). Cet échappement du RE a été observé dans des cellules végétales (Borisjuk *et al.*, 1998), chez des cellules B16 de mélanome de souris (Zhu *et al.*, 1997), des cellules Vero (Day *et al.*, 2000) ou encore des lignées NG108-15 de cellules neuronales (Xiao *et al.*, 1999). Récemment, des propriétés immunomodulatrices de la CRT a été mise en évidence dans des extraits solubles de *Leishmania donovani* (Gupta *et al.*, 2008). Par ailleurs, des homologues de la CRT ont été mis en évidence chez plusieurs parasites tels qu'*Onchocerca Volvulus* (McCauliffe *et al.*, 1990), *Necator americanus* (Pritchard *et al.*, 1999) ainsi qu'*Amblyomma americanum* (Sanders *et al.*, 1998). Aujourd'hui nous ajoutons la CRT de *T. congolense* à cette liste, en particulier celle présente dans le sécrétome, validée par les prédictions du logiciel « Secretome P », comme porteuse d'un peptide signal des voies de sécrétion.

La présence de plusieurs isoformes de CRT fortement surexprimées souligne l'importance de cette protéine dans le sécrétome d'IL3000 et constitue un marqueur de virulence et de pathogénicité chez *T. congolense*.

4.3.4 Comparaison des sécrétomes et enjeux stratégiques pour *T. congolense*

En dépit des 723 spots présentant le même niveau d'expression quelque soit la souche considérée, la variabilité des comportements chez l'hôte mammifère des deux clones de *T. congolense*, exprimée au niveau moléculaire nous a autorisé une nouvelle lecture du sécrétome. L'analyse du différentiel d'expression des protéines issues du sécrétome des deux clones, nous a permis de caractériser 9 protéines surexprimées dans le sécrétome provenant de la souche la plus virulente et la plus pathogène, et *a contrario* 7 protéines surexprimées chez la souche la moins virulente et la moins pathogène.

La comparaison des sécrétomes de chaque souche révèle néanmoins que 3 groupes de protéines ont une identification identique chez les deux clones. La comparaison de l'alignement expérimental de ces protéines, nous montre qu'il s'agit dans chacun des cas d'isoformes à des degrés de phosphorylation différents et/ou de poids moléculaires différents selon les clones. Cette observation confirme la spécificité des composants moléculaires de chacun des deux sécrétomes et nous permet de définir plusieurs candidates en tant que marqueurs d'infectiosité. On retrouve la

CRT, à laquelle viennent s'ajouter les chaînes α et β de la tubuline, l'énolase, la cystéine protéase (CP), le facteur 2 d'élongation, l'ATP-synthase vacuolaire, l'arginine kinase et l'oxydoréductase FMN/FAD NADPH dépendante.

Ces marqueurs constituent autant d'atouts pour la mise en place de stratégies d'interférence avec les processus infectieux, en tant que cibles potentielles de traitements chimiothérapeutiques ou en tant que facteurs d'immunoprotection. C'est en ce sens que la continuité de cette étude pourrait s'orienter, notamment dans la génération d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines.

4.3.5 Profils sérologiques liés à la trypanosusceptibilité

L'étude du sécrétome portant sur la 1^e phrase du dialogue entre le trypanosome et son hôte, il nous a paru intéressant d'observer quelles pouvaient être les réponses de l'hôte à cette 1^e phrase. Nous avons donc mis en œuvre des protocoles d'immuno-empreintes, afin de tester la réponse de l'hôte naturel, en utilisant des sérums de bovins trypanosensibles et de bovins trypanotolérants.

La réalisation d'immuno-empreintes 1-D sur plusieurs bandelettes sur lesquelles ont été transférées les protéines du sécrétome, nous a permis de constater l'absence de reconnaissance du sécrétome par les sérums de bovins. La présence de signaux sur les bandelettes sur lesquelles ont été transférées les protéines du protéome, en utilisant les mêmes lots de sérums que pour le sécrétome, nous conforte sur la qualité de réalisation des analyses en immuno-empreintes sur les 2 types d'échantillons. Il semble donc que, d'un point de vue antigénique, le sécrétome soit immunologiquement silencieux, bien qu'il contienne de puissants immunomodulateurs.

Les résultats obtenus avec les immuno-empreintes 2-D sur le protéome d'IL3000 mettent en avant une variabilité individuelle de la réponse des bovins infectés, qu'ils soient trypanosensibles ou trypanotolérants. On observe aussi une spécificité de réponse des trypanosensibles, qui présentent le plus grand nombre d'empreintes, et des trypanotolérants, avec l'absence d'une empreinte pourtant commune aux sérums de bovins trypanosensibles. Ceci nous conduit à suggérer que l'absence d'une réponse polyclonale aux signaux parasitaires est une caractéristique de la trypanotolérance. Plus spécifique, cette réponse pourrait cibler des facteurs clés de la virulence et de la pathogénicité des trypanosomes.

L'absence de signal sur le sécrétome reste cohérente avec l'hypothèse d'une sécrétion de produits solubles immunologiquement actifs, mais silencieux chez l'hôte infecté. La baisse du taux de

leucocyte bien avant l'apparition des premiers trypanosomes observables dans le sang de l'hôte conforte cette hypothèse. Récemment, Radwanska *et al.* (2008) ont mis en évidence chez des souris infectées avec *T. brucei*, la perte de réponse antiparasitaire durable, des lymphocytes B et l'abolition de la réponse-mémoire induite par vaccination.

Nous en concluons que la variation antigénique ne saurait être considérée comme unique voie d'échappement du parasite, les résultats présentés dans ce mémoire nous permettent de proposer le sécrétome comme premier élément de la stratégie du trypanosome.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude a contribué à apporter à la recherche sur les trypanosomoses deux éléments significatifs : une approche méthodologique standardisée transférable à d'autres trypanosomoses et l'identification ciblée d'un petit nombre de molécules d'intérêt.

Plusieurs analyses supplémentaires sont envisagées pour approfondir les résultats obtenus et font l'objet de perspectives de recherche à court, moyen et long terme :

- Confirmer par l'analyse en 2-D DIGE le différentiel sécrétome / protéome.
- Continuer à consulter la base de données SwissProt/TrEMBL afin de procéder régulièrement aux mises à jour de l'identification des protéines sur *T. congolense*, notamment avec les identifications hypothétiques ou non caractérisées de l'approche exhaustive ; ce travail de veille nous permettra d'affiner le choix des protéines candidates pour le développement de nouveaux tests diagnostics, comme cibles thérapeutiques ou dans des essais immunoprophylactiques. D'ors et déjà, HSP70, KMP11 et PFR2 ont déjà fait l'objet d'une évaluation dans un modèle expérimental de leishmaniose viscérale canine (Carrillo *et al.*, 2008) ; tandis que Lemesre *et al.* (2007) ont testé avec succès sur des chiens l'effet protecteur des PES de promastigotes de *Leishmania* (autre *Trypanosomatidae*), ce qui renforce l'intérêt l'attention particulière à donner aux molécules du compartiment biologique sécrétome.
- Approfondir le rôle joué par les protéines candidates, par des études fonctionnelles de leur rôle chez le parasite, mais également sur les cellules du système immunitaire de l'hôte. Le trypanosome étant un organisme modèle pour les expériences d'ARN interférence (Balaña-Fouce et Reguera, 2007) il sera aisé de tester le rôle fonctionnel de nos molécules candidates, en particulier dans le cadre de notre collaboration avec l'équipe du Pr. Etienne Pays de l'Université Libre de Bruxelles (ULB). D'autre part, la production des protéines recombinantes natives correspondant à nos candidates, nous permettra d'étudier leur(s) rôle(s) fonctionnel(s), seule ou en association, dans le dialogue moléculaire avec les cellules de l'hôte.

- Approfondir la question de la reconnaissance de l'hôte en travaillant, dans un nouveau projet de recherche, la variabilité de la réponse individuelle des bovins trypanosensibles et trypanotolérants. Une collaboration étroite avec le CIRDES nous permet d'envisager la création d'une nouvelle sérothèque à partir de bovins infectés expérimentalement et naturellement. Des sérums de ces animaux constitueront la base de l'immunocriblage du sécrétome et du protéome de *T. congolense* initié par les travaux préliminaires de ce mémoire.

Ces éléments nous permettent aussi d'envisager l'application de notre démarche à d'autres trypanosomoses. D'ailleurs, au sein du projet européen INCODEV-TRYPADVAC2, une démarche similaire est en cours de développement sur le modèle de *T. evansi*, pathogène d'importance économique pour l'élevage bovin et équin en Amérique du Sud. Ce modèle présente également des clones virulents et avirulents pouvant être utilisés dans une approche comparative. Nous travaillons d'ailleurs actuellement, en collaboration avec l'équipe du Dr. Pedro Aso de la faculté des sciences de l'université Simon Bolivar (Caracas, Venezuela), au développement de ce nouveau modèle.

Enfin, l'UMR117 de l'IRD intervenant dans le domaine de la trypanosomose humaine, l'application de la démarche initiée avec *T. congolense* va être appliquée au modèle *T. brucei gambiense*, qui est à l'origine de l'étude du sécrétome (Holzmuller *et al.*, 2008). En effet, les différents tableaux cliniques observés chez les malades, liés soit à des différences de virulence ou de pathogénicité, soit à des différences de susceptibilité individuelles (existence de cas d'asymptomatisme, Jammoneau *et al.*, 2004) sont autant de critères qui nous conduisent à proposer d'appliquer notre méthode standardisée pour aborder l'étude de la trypanosomose humaine africaine.

L'ensemble de ces contributions ont toutes pour but de déboucher sur la mise au point de nouveaux marqueurs diagnostic, et d'augmenter la possibilité de pouvoir disposer au plus vite de nouveaux traitements ou d'un vaccin pour pouvoir lutter plus efficacement contre les maladies négligées que sont les trypanosomoses.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Aguillón JC, Ferreira L, Pérez C, Colombo A, Molina MC, Wallace A, Solari A, Carvallo P, Galindo M, Galanti N, Orn A, Billetta R, Ferreira A. Tc45, a dimorphic *Trypanosoma cruzi* immunogen with variable chromosomal localization, is calreticulin. *Am J Trop Med Hyg.* 2000 Nov-Dec; 63(5-6): 306-12.
2. Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhães JB, Netto MB. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol.* 1985 Aug;79(4):397-407.
3. Andrianarivo AG, Muiya P, Opollo M, Logan-Henfrey LL. *Trypanosoma congolense*: comparative effects of a primary infection on bone marrow progenitor cells from N'Dama and Boran cattle. *Exp Parasitol.* 1995 May; 80(3): 407-18.
4. Authié E, Duvallet G, Robertson C, Williams DJ. Antibody responses to a 33 kDa cysteine protease of *Trypanosoma congolense*: relationship to 'trypanotolerance' in cattle. *Parasite Immunol.* 1993 Aug; 15(8): 465-74.
5. Authié E, Muteti DK, Mbawa ZR, Lonsdale-Eccles JD, Webster P, Wells CW. Identification of a 33-kilodalton immunodominant antigen of *Trypanosoma congolense* as a cysteine protease. *Mol Biochem Parasitol.* 1992 Nov; 56(1): 103-16.
6. Authié E, Pobel T. Serum haemolytic complement activity and C3 levels in bovine trypanosomiasis under natural conditions of challenge--early indications of individual susceptibility to disease. *Vet Parasitol.* 1990 Feb; 35(1-2): 43-59.
7. Authié E. Trypanosomiasis and trypanotolerance in cattle: a role for congopain? *Parasitol Today.* 1994 Sep; 10(9): 360-4.
8. Bakker N, Vervelde L, Kanobana K, Knox DP, Cornelissen AW, de Vries E, Yatsuda AP. Vaccination against the nematode *Haemonchus contortus* with a thiol-binding fraction from the excretory/secretory products (ES). *Vaccine.* 2004 Jan 26; 22(5-6): 618-28.
9. Bannai H, Sakurai T, Inoue N, Sugimoto C, Igarashi I. Cloning and expression of mitochondrial heat shock protein 70 of *Trypanosoma congolense* and potential use as a diagnostic antigen. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003 Sep; 10(5): 926-33.
10. Basu R, Bhaumik S, Basu JM, Naskar K, De T, Roy S. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral Leishmaniasis. *J Immunol.* 2005 Jun 1; 174(11): 7160-71.
11. Bengaly Z, Sidibe I, Boly H, Sawadogo L, Desquesnes M. Comparative pathogenicity of three genetically distinct *Trypanosoma congolense*-types in inbred Balb/c mice. *Vet Parasitol.* 2002 Apr 30; 105(2): 111-8.
12. Bengaly Z, Sidibe I, Ganaba R, Desquesnes M, Boly H, Sawadogo L. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet Parasitol.* 2002 Aug 30; 108(1): 1-19.
13. Berger BJ, Dai WW, Wang H, Stark RE, Cerami A. Aromatic amino acid transamination and methionine recycling in *Trypanosomatids*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Apr 30; 93(9): 4126-30.
14. Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. *Trends Biochem Sci.* 1994 Mar; 19(3):124-8. Review.

15. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H *et al.* . The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science*. 2005 Jul 15; 309(5733): 416-22.
16. Beyrodt CG, Pinto AR, Freymüller E, Barbiéri CL. Characterization of an antigen from *Leishmania amazonensis* amastigotes able to elicit protective responses in a murine model. *Infect Immun*. 1997 Jun; 65(6): 2052-9.
17. Biron DG, Brun C, Lefevre T, Lebarbenchon C, Loxdale HD, Chevenet F, Brizard JP, Thomas F. The pitfalls of proteomics experiments without the correct use of bioinformatics tools. *Proteomics*. 2006 Oct; 6(20): 5577-96. Review.
18. Borisjuk N, Sitailo L, Adler K, Malysheva L, Tewes A, Borisjuk L, Manteuffel R. Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta*. 1998 Nov; 206(4): 504-14.
19. Borst P, Rudenko G, Blundell PA, van Leeuwen F, Cross MA, McCulloch R, Gerrits H, Chaves IM. Mechanisms of antigenic variation in African trypanosomes. *Behring Inst Mitt*. 1997 Mar; (99): 1-15. Review
20. Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance. A review. *Acta Oncol*. 1991; 30(1): 87-105. Review
21. Boulangé A, Authié E. A 69 kDa immunodominant antigen of *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* is homologous to immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP). *Parasitology*. 1994 Aug; 109 (Pt 2): 163-73.
22. Boulangé A, Katende J, Authié E. *Trypanosoma congolense*: expression of a heat shock protein 70 and initial evaluation as a diagnostic antigen for bovine trypanosomosis. *Exp Parasitol*. 2002 Jan; 100(1): 6-11.
23. Búa J, Fichera LE, Fuchs AG, Potenza M, Dubin M, Wenger RO, Moretti G, Scabone CM, Ruiz AM. Anti-*Trypanosoma cruzi* effects of cyclosporin A derivatives: possible role of a P-glycoprotein and parasite cyclophilins. *Parasitology*. 2008 Feb; 135(2): 217-28. Epub 2007 Oct 9.
24. Carrillo E, Crusat M, Nieto J, Chicharro C, Thomas Mdel C, Martínez E, Valladares B, Cañavate C, Requena JM, López MC, Alvar J, Moreno J. Immunogenicity of HSP-70, KMP-11 and PFR-2 Leishmanial antigens in the experimental model of canine visceral Leishmaniasis. *Vaccine*. 2008 Mar 28; 26(15): 1902-11. Epub 2008 Feb 13.
25. Carroll MC, Prodeus AP. Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*. 1998 Feb; 10(1): 36-40. Review.
26. Cazzulo JJ, Couso R, Raimondi A, Wernstedt C, Hellman U. Further characterization and partial amino acid sequence of a cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1989 Feb; 33(1): 33-41 Chagas *et al.*, 1997
27. Chambers JW, Fowler ML, Morris MT, Morris JC. The anti-*Trypanosomal* agent lonidamine inhibits *Trypanosoma brucei* hexokinase 1. *Mol Biochem Parasitol*. 2008 Apr; 158(2): 202-7. Epub 2008 Jan 3.
28. Chevalier N, Rigden DJ, Van Roy J, Opperdoes FR, Michels PA. *Trypanosoma brucei* contains a 2,3-bisphosphoglycerate independent phosphoglycerate mutase. *Eur J Biochem*. 2000 Mar; 267(5): 1464-72.
29. Chevallet M, Tastet C, Luche S, Rabilloud T. Preparing protein extracts for quantitative two-dimensional gel comparison. *Curr Protoc Protein Sci*. 2004 Aug; Chapter 22:Unit 22.4.
30. Clayton CE, Michels P. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol Today*. 1996 Dec; 12 (12): 465-71.
31. Cross M, Taylor MC, Borst P. Frequent loss of the active site during variant surface glycoprotein expression site switching in vitro in *Trypanosoma brucei*. *Mol Cell Biol*. 1998 Jan; 18(1): 198-205.

32. Da Silva Giotto MT, Hannaert V, Vertommen D, de A S Navarro MV, Rider MH, Michels PA, Garratt RC, Rigden DJ. The crystal structure of *Trypanosoma brucei* enolase: visualisation of the inhibitory metal binding site III and potential as target for selective, irreversible inhibition. *J Mol Biol.* 2003 Aug 15; 331(3): 653-65.
33. Day PJ, Owens SR, Wesche J, Olsnes S, Roberts LM, Lord JM. An interaction between ricin and calreticulin that may have implications for toxin trafficking. *J Biol Chem.* 2001 Mar 9; 276(10): 7202-8. Epub 2000 Dec 11.
34. De Souza W. Secretory organelles of pathogenic protozoa. *An. Braz. Ac. Sc.,* 2006 78(2): 271-91.
35. Delespaux V, Geysen D, Majiwa PA, Geerts S. Identification of a genetic marker for isometamidium chloride resistance in *Trypanosoma congolense*. *Int J Parasitol.* 2005 Feb; 35(2): 235-43. Epub 2004 Dec 25.
36. Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Jan; 98(1):1-12. Epub 2003 Apr 9.
37. Downey N, Donelson JE. Expression of foreign proteins in *Trypanosoma congolense*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999 Oct 25; 104(1): 39-53.
38. Drew ME, Morris JC, Wang Z, Wells L, Sanchez M, Landfear SM, Englund PT. The adenosine analog tubercidin inhibits glycolysis in *Trypanosoma brucei* as revealed by an RNA interference library. *J Biol Chem.* 2003 Nov 21; 278(47): 46596-600. Epub 2003 Sep 12.
39. Dumas M, Bouteille B. [Current status of trypanosomiasis] *Med Trop (Mars).* 1997; 57(3 Suppl): 65-9. French
40. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J *et al.* .Comparative genomics of *Trypanosomatid* parasitic protozoa. *Science.* 2005 Jul 15; 309(5733): 404-9.
41. Engstler M, Thilo L, Weise F, Grünfelder CG, Schwarz H, Boshart M, Overath P. Kinetics of endocytosis and recycling of the GPI-anchored variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.* 2004 Mar 1; 117(Pt 7): 1105-15. Erratum in: *J Cell Sci.* 2004 Jul 15; 117(Pt 16): 3703.
42. Espinoza-Fonseca LM, Trujillo-Ferrara JG. Exploring the possible binding sites at the interface of triosephosphate isomerase dimer as a potential target for anti-trypansomal drug design. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 Jun 21; 14(12): 3151-4.
43. Evans DA. Cyclical transmission of *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Trypanosoma congolense* by tsetse flies infected with culture-form procyclic trypanosomes. *J Protozool.* 1979 Aug; 26(3): 425-7 *FAO*, 1998
44. Fish WR, Muriuki CW, Muthiani AM, Grab DJ, Lonsdale-Eccles JD. Disulfide bond involvement in the maintenance of the cryptic nature of the cross-reacting determinant of metacyclic forms of *Trypanosoma congolense*. *Biochemistry.* 1989 Jun 27; 28(13): 5415-21.
45. Fliegel L, Burns K, Wlasichuk K, Michalak M. Peripheral membrane proteins of sarcoplasmic and endoplasmic reticulum. Comparison of carboxyl-terminal amino acid sequences. *Biochem Cell Biol.* 1989 Oct; 67(10):696-702. Review.
46. Forget G, Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of host protein tyrosine phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani* -induced inhibition of nitric oxide production. *Infect Immun.* 2006 Nov; 74(11): 6272-9.
47. Frevert U, Reinwald E. *Trypanosoma congolense* bloodstream forms evade complement lysis in vitro by shedding of immune complexes. *Eur J Cell Biol.* 1990 Aug; 52(2): 264-9.
48. Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, Elliott T. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity.* 2002 Jan;16(1):99-109.

49. Garba SA, Terry RJ, Lamorde AG. Effect of booster dose on the immunity of cattle to mycoplasma vaccines. *Vet Rec.* 1991 Feb 16; 128(7): 155-6.
50. Geigy R, Kauffmann M. Sleeping sickness survey in the Serengeti area (Tanzania) 1971. I. Examination of large mammals for trypanosomes. *Acta Trop.* 1973; 30(1): 12-23.
51. Gibson W. Species concepts for trypanosomes: from morphological to molecular definitions? *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003 Oct 28; 2(1): 10. Godfrey, 1961
52. Godfrey DG. Types of *Trypanosoma congolense*. II. Differences in the courses of infection. *Ann Trop Med Parasitol.* 1961 Jul; 55:154-66.
53. Guerrero SA, Lopez JA, Steinert P, Montemartini M, Kalisz HM, Colli W, Singh M, Alves MJ, Flohé L. His-tagged tryparedoxin peroxidase of *Trypanosoma cruzi* as a tool for drug screening. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2000 Apr; 53(4): 410-4.
54. Gupta SK, Sisodia BS, Sinha S, Hajela K, Naik S, Shasany AK, Dube A. Proteomic approach for identification and characterization of novel immunostimulatory proteins from soluble antigens of *Leishmania donovani* promastigotes. *Proteomics.* 2007 Mar; 7(5): 816-23
55. Hambrey PN, Mellors A, Tizard IR. The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic *Trypanosoma* species. *Mol Biochem Parasitol.* 1981 Feb; 2(3-4): 177-86.
56. Hannaert V, Brinkmann H, Nowitzki U, Lee JA, Albert MA, Sensen CW, Gaasterland T, Müller M, Michels P, Martin W. Enolase from *Trypanosoma brucei*, from the amitochondriate protist *Mastigamoeba balamuthi*, and from the chloroplast and cytosol of *Euglena gracilis*: pieces in the evolutionary puzzle of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol.* 2000 Jul; 17(7): 989-1000.
57. Heby O, Persson L, Rentala M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and Leishmaniasis. *Amino Acids.* 2007 Aug; 33(2): 359-66. Epub 2007 Jul 4. Review.
58. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug; 2(8): 627-33. Review.
59. Herbert WJ, Lumsden WH. *Trypanosoma brucei*: a rapid "matching" method for estimating the host's parasitemia. *Exp Parasitol.* 1976 Dec; 40(3):427-31.
60. Hoare CA. Letter: "*Trypanosoma brucei*-subgroup". *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1973; 67(3): 421-2.
61. Holzmüller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Gonçalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V. Virulence and pathogenicity patterns of *Trypanosoma brucei* gambiense field isolates in experimentally infected mouse: differences in host immune response modulation by secretome and proteomics. *Microbes Infect.* 2008 Jan; 10(1):79-86. Epub 2007 Oct 22.
62. Irfan M. *Trypanosoma congolense*: infectivity for white mice. *Exp Parasitol.* 1968 Oct; 23(2): 254-9.
63. Jennings FW, Whitelaw DD, Holmes PH, Urquhart GM. The susceptibility of strains of mice to infection with *Trypanosoma congolense*. *Res Vet Sci.* 1978 Nov;25(3):399-400.
64. Jethmalani SM, Henle KJ, Gazitt Y, Walker PD, Wang SY. Intracellular distribution of heat-induced stress glycoproteins. *J Cell Biochem.* 1997 Jul 1; 66(1):98-111.
65. Johnson S, Michalak M, Opas M, Eggleton P. The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol.* 2001 Mar; 11(3): 122-9. Review.
66. Katunguka-Rwakishaya E, Murray M, Holmes PH. Pathophysiology of *Trypanosoma congolense* infection in two breeds of sheep, Scottish blackface and Finn Dorset. *Vet Parasitol.* 1997 Feb;68(3):215-25.

67. Kaushik RS, Uzonna JE, Radzioch D, Gordon JR, Tabel H. Innate resistance to experimental *Trypanosoma congolense* infection: differences in IL-10 synthesis by macrophage cell lines from resistant and susceptible inbred mice. *Parasite Immunol.* 1999 Mar; 21(3): 119-31.
68. Kimmel BE, Samson S, Wu J, Hirschberg R, Yarbrough LR. Tubulin genes of the African trypanosome *Trypanosoma brucei rhodesiense*: nucleotide sequence of a 3.7-kb fragment containing genes for alpha and beta tubulins. *Gene.* 1985; 35(3): 237-48.
69. Knowles G, Betschart B, Kukla BA, Scott JR, Majiwa PA. Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitology.* 1988 Jun; 96 (Pt 3): 461-74.
70. Kohl L, Bastin P. The flagellum of trypanosomes. *Int Rev Cytol.* 2005; 244: 227-85.
71. Kohl L, Drmota T, Thi CD, Callens M, Van Beeumen J, Opperdoes FR, Michels PA. Cloning and characterization of the NAD-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenases of *Trypanosoma brucei brucei* and *Leishmania mexicana mexicana* and expression of the trypanosome enzyme in *Escherichia coli*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 Feb-Mar; 76(1-2): 159-73.
72. Kovacs H, Campbell ID, Strong P, Johnson S, Ward FJ, Reid KB, Eggleton P. Evidence that C1q binds specifically to CH2-like immunoglobulin gamma motifs present in the autoantigen calreticulin and interferes with complement activation. *Biochemistry.* 1998 Dec 22; 37(51): 17865-74.
73. Kyhse-Andersen J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods.* 1984 Dec; 10(3-4): 203-9.
74. Ladikpo E, Seureau C. [Localization of *Trypanosoma (Nannomonas) congolense* Broden, 1904 (Kinetoplastida, *Trypanosomatidae*) in the proboscis of *Glossina morsitans morsitans* Westwood, 1850 (Diptera, Glossinidae)]. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1988; 63(3):193-6. French.
75. Lanham SM, Godfrey DG. Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. *Exp Parasitol.* 1970 Dec; 28(3):521-34.
76. Lemesre JL, Holzmuller P, Cavaleyra M, Gonçalves RB, Hottin G, Papierok G. Protection against experimental visceral Leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine.* 2005 Apr 22; 23(22): 2825-40.
77. Lemesre JL, Holzmuller P, Gonçalves RB, Bourdoiseau G, Hugnet C, Cavaleyra M, Papierok G. Long-lasting protection against canine visceral Leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomised efficacy field trial. *Vaccine.* 2007 May 22; 25(21): 4223-34. Epub 2007 Mar 15.
78. Li SQ, Fung MC, Reid SA, Inoue N, Lun ZR. Immunization with recombinant beta-tubulin from *Trypanosoma evansi* induced protection against *T. evansi*, *T. equiperdum* and *T. b. brucei* infection in mice. *Parasite Immunol.* 2007 Apr; 29(4): 191-9.
79. Li X, Du A, Cai W, Hou Y, Pang L, Gao X. Evaluation of a recombinant excretory secretory *Haemonchus contortus* protein for use in a diagnostic enzyme-linked immunosorbent assay. *Exp Parasitol.* 2007 Mar; 115(3): 242-6.
80. Liu EW, Otesile EB, Tabel H. Immune lysis of *Trypanosoma congolense*: generation of a soluble covalent complex of variant surface glycoprotein and bovine complement component C3b. *Vet Immunol Immunopathol.* 1993 Sep; 38(1-2): 169-81.
81. Lubega GW, Byarugaba DK, Prichard RK. Immunization with a tubulin-rich preparation from *Trypanosoma brucei* confers broad protection against African trypanosomiasis. *Exp Parasitol.* 2002 Sep; 102(1): 9-22

82. Lutje V, Mertens B, Boulangé A, Williams DJ, Authié E. *Trypanosoma congolense*: proliferative responses and interleukin production in lymph node cells of infected cattle. *Exp Parasitol*. 1995 Sep; 81(2): 154-64.
83. Marcelain K, Colombo A, Molina MC, Ferreira L, Lorca M, Aguillón JC, Ferreira A. Development of an immunoenzymatic assay for the detection of human antibodies against *Trypanosoma cruzi* calreticulin, an immunodominant antigen. *Acta Trop*. 2000 May 31; 75(3): 291-300.
84. Matthews KR. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci*. 2005 Jan 15; 118(Pt 2): 283-90. Review. Erratum in: *J Cell Sci*. 2005 May 1; 118(Pt 9): 2078.
85. Mbawa ZR, Gumm ID, Shaw E, Lonsdale-Eccles JD. Characterisation of a cysteine protease from bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. *Eur J Biochem*. 1992 Feb 15; 204(1): 371-9.
86. McCauliffe DP, Zappi E, Lieu TS, Michalak M, Sontheimer RD, Capra JD. A human Ro/SS-A autoantigen is the homologue of calreticulin and is highly homologous with onchocercal RAL-1 antigen and an alysia "memory molecule". *J Clin Invest*. 1990 Jul; 86(1): 332-5.
87. McNamara JJ, Mohammed G, Gibson WC. *Trypanosoma* (Nannomonas) *godfreyi* sp. nov. from tsetse flies in The Gambia: biological and biochemical characterization. *Parasitology*. 1994 Nov; 109 (Pt 4): 497-509. Erratum in: *Parasitology* 1995 Jan; 110(Pt 1): 113.
88. Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*. 1998 Oct; 10(5): 351-3. Review.
89. Michalak M, Corbett EF, Mesaeli N, Nakamura K, Opas M. Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J*. 1999 Dec 1; 344 Pt 2:281-92. Review.
90. Michalak M, Robert Parker JM, Opas M. Ca²⁺ signaling and calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. *Cell Calcium*. 2002 Nov-Dec;32(5-6):269-78. Review.
91. Miranda MR, Canepa GE, Bouvier LA, Pereira CA. *Trypanosoma cruzi*: Oxidative stress induces arginine kinase expression. *Exp Parasitol*. 2006 Dec; 114(4):341-4. Epub 2006 May 24.
92. Morell M, Thomas MC, Caballero T, Alonso C, López MC. The genetic immunization with paraflagellar rod protein-2 fused to the HSP70 confers protection against late *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine*. 2006 Nov 30; 24(49-50): 7046-55. Epub 2006 Jul 21.
93. Morlais I, Grebaut P, Bodo JM, Djoha S, Cuny G. Characterization of trypanosome infections by polymerase chain reaction (PCR) amplification in wild tsetse flies in Cameroon. *Parasitology*. 1998 Jun; 116 (Pt 6): 547-54.
94. Mottram JC, Brooks DR, Coombs GH. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host-parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Aug; 1(4): 455-60. Review.
95. Murray M, Dexter TM. Anaemia in bovine African trypanosomiasis. A review. *Acta Trop*. 1988 Dec; 45(4): 389-432.
96. Murray M, Murray PK, McIntyre WI. An improved parasitological technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977; 71(4): 325-6.
97. Murray M. Factors affecting duration and intensity of trypanosome infection of domestic animals. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1989; 69 Suppl 1: 189-96; discussion 212-4.
98. Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Mol Biochem Parasitol*. 1990 Nov; 43(1): 27-38.
99. Naessens J, Kitani H, Momotani E, Sekikawa K, Nthale JM, Iraqi F. Susceptibility of TNF-alpha-deficient mice to *Trypanosoma congolense* is not due to a defective antibody response. *Acta Trop*. 2004 Nov-Dec; 92(3): 193-203.

100. Nantulya VM, Musoke AJ, Rurangirwa FR, Molloo SK. Resistance of cattle to tsetse-transmitted challenge with *Trypanosoma brucei* or *Trypanosoma congolense* after spontaneous recovery from syringe-passaged infections. *Infect Immun*. 1984 Feb; 43(2): 735-8.
101. Nielsen K. Complement in trypanosomiasis. In: Tizard I, editor. *Immunology and pathogenesis of trypanosomiasis*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1985; 133-144.
102. Nogueira de Melo AC, Meirelles MN, Porrozzi R, Costa JD, Branquinha MH, Vermelho AB. Reduced activity of matrix metalloproteinase-9 in *Trypanosoma cruzi*-infected mouse embryo hepatocyte cell. *Hepato Res*. 2004 Jan; 28(1): 49-56
103. Nok AJ. Azaanthraquinone inhibits respiration and in vitro growth of long slender bloodstream forms of *Trypanosoma congolense*. *Cell Biochem Funct*. 2002 Sep; 20(3): 205-12.
104. North MJ, Mottram JC, Coombs GH. Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1990 Aug;6(8):270-5
105. Olivares-Illana V, Pérez-Montfort R, López-Calahorra F, Costas M, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez Puyou A. Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multi*Trypanosomatid* inhibitor. *Biochemistry*. 2006 Feb 28; 45(8): 2556-60
106. Overath P, Stierhof YD, Wiese M. Endocytosis and secretion in *Trypanosomatid* parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol*. 1997 Jan; 7(1): 27-33.
107. Paling RW, Molloo SK, Jenni L. *Trypanosoma congolense*: host responses following tsetse transmitted infection of Kilifi isolates in goats. *Exp Parasitol*. 1987 Jun; 63(3): 279-87.
108. Pays E. The variant surface glycoprotein as a tool for adaptation in African trypanosomes. *Microbes Infect*. 2006 Mar; 8(3): 930-7. Epub 2006 Jan 11.
109. Pellé R, McOdimba F, Chuma F, Wasawo D, Pearson TW, Murphy NB. The African trypanosome cyclophilin A homologue contains unusual conserved central and N-terminal domains and is developmentally regulated. *Gene*. 2002 May 15; 290(1-2): 181-91.
110. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, Flawiá MM. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *J Biol Chem*. 2000 Jan 14; 275(2): 1495-501.
111. Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, Flawiá MM. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. *FEBS Lett*. 2003 Nov 6; 554(1-2): 201-5.
112. Pinder M, Fumoux F, van Melick A, Roelants GE. The role of antibody in natural resistance to African trypanosomiasis. *Vet Immunol Immunopathol*. 1987 Dec; 17(1-4): 325-32.
113. Pinder M, Bauer J, Van Melick A, Fumoux F. Immune responses of trypanoresistant and trypanosusceptible cattle after cyclic infection with *Trypanosoma congolense*. *Vet Immunol Immunopathol*. 1988 Apr; 18(3): 245-57.
114. Pritchard DI, Brown A, Kasper G, McElroy P, Loukas A, Hewitt C, Berry C, Füllkrug R, Beck E. A hookworm allergen which strongly resembles calreticulin. *Parasite Immunol*. 1999 Sep; 21(9): 439-50.
115. Probst P, Skeiky YA, Steeves M, Gervassi A, Grabstein KH, Reed SG. A *Leishmania* protein that modulates interleukin (IL)-12, IL-10 and tumor necrosis factor-alpha production and expression of B7-1 in human monocyte-derived antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*. 1997 Oct; 27(10): 2634-42.

116. Qazi KR, Wikman M, Vasconcelos NM, Berzins K, Ståhl S, Fernández C. Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of *Plasmodium falciparum* malarial antigen gene fused with a fragment of HSP70 gene. *Vaccine*. 2005 Jan 19; 23(9): 1114-25.
117. Radwanska M, Magez S, Michel A, Stijlemans B, Geuskens M, Pays E. Comparative analysis of antibody responses against HSP60, invariant surface glycoprotein 70, and variant surface glycoprotein reveals a complex antigen-specific pattern of immunoglobulin isotype switching during infection by *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*. 2000 Feb; 68(2): 848-60.
118. Rapp M, Haubrich TA, Perrault J, Mackey ZB, McKerrow JH, Chiang PK, Wnuk SF. Anti*Trypanosomal* activity of 5'-deoxy-5'-(iodomethylene) adenosine and related 6-N-cyclopropyladenosine analogues. *J Med Chem*. 2006 Mar 23; 49(6): 2096-102.
119. Rausch S, Shayan P, Salnikoff J, Reinwald E. Sequence determination of three variable surface glycoproteins from *Trypanosoma congolense*. Conserved sequence and structural motifs. *Eur J Biochem*. 1994 Aug 1; 223(3): 813-21.
120. Ridgley E, Webster P, Patton C, Ruben L. Calmodulin-binding properties of the paraflagellar rod complex from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 2000 Jul; 109(2): 195-201
121. Sanders ML, Jaworski DC, Sanchez JL, DeFraités RF, Glass GE, Scott AL, Raha S, Ritchie BC, Needham GR, Schwartz BS. Antibody to a cDNA-derived calreticulin protein from *Amblyomma americanum* as a biomarker of tick exposure in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Aug; 59(2): 279-85.
122. Schallig HD, Moyo DZ, Hendriks WM, Eysker M. Bovine humoral immune responses to *Haemonchus placei* excretory/secretory antigens. *Vet Parasitol*. 1996 Oct 25; 65(3-4): 289-96.
123. Schallig HD, van Leeuwen MA, Hendriks WM. Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*. *Parasitology*. 1994 Apr; 108 (Pt 3): 351-7.
124. Scory S, Steverding D. Differential toxicity of ricin and diphtheria toxin for bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 Dec 1; 90(1): 289-95.
125. Scory S, Stierhof YD, Caffrey CR, Steverding D. The cysteine proteinase inhibitor Z-Phe-Ala-CHN2 alters cell morphology and cell division activity of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms in vivo. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2007 Feb 28; 6: 2.
126. Shakibaei M, Frevert U. Cell surface interactions between *Trypanosoma congolense* and macrophages during phagocytosis in vitro. *J Protozool*. 1992 Jan-Feb; 39(1): 224-35.
127. Shlomai J. The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med*. 2004 Sep; 4(6): 623-47.
128. Soong L, Duboise SM, Kima P, McMahon-Pratt D. *Leishmania pifanoi* amastigote antigens protect mice against cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun*. 1995 Sep; 63(9): 3559-66.
129. Spector T, Berens RL, Marr JJ. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*, Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol*. 1982 Jan 15; 31(2): 225-9.
130. Tabel H, Kaushik RS, Uzonna J. Experimental African trypanosomiasis: differences in cytokine and nitric oxide production by macrophages from resistant and susceptible mice. *Pathobiology*. 1999; 67(5-6): 273-6
131. Taylor KA. Immune responses of cattle to African trypanosomes: protective or pathogenic? *Int J Parasitol*. 1998 Feb; 28(2): 219-40. Review.

132. Thévenaz P, Hecker H. Distribution and attachment of *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense* in the proximal part of the proboscis of *Glossina morsitans morsitans*. Acta Trop. 1980 Jun; 37(2): 163-75.
133. Thomas *et al.*, 2000
134. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep; 76(9): 4350-4.
135. Trombetta ES. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. Glycobiology. 2003 Sep; 13(9): 77R-91R. Epub 2003 May 7. Review.
136. Trujillo C, Ramírez R, Vélez ID, Berberich C. The humoral immune response to the kinetoplastid membrane protein-11 in patients with American Leishmaniasis and Chagas disease: prevalence of IgG subclasses and mapping of epitopes. Immunol Lett. 1999 Dec 1; 70(3): 203-9.
137. Van den Bossche P, Rowlands GJ. The relationship between the parasitological prevalence of *Trypanosomal* infections in cattle and herd average packed cell volume. Acta Trop. 2001 Feb 23; 78(2):163-70.
138. Vertommen D, Van Roy J, Szikora JP, Rider MH, Michels PA, Opperdoes FR. Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2008 Apr; 158(2):189-201. Epub 2007 Dec 23.
139. Vincendeau P, Bouteille B. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. An Acad Bras Cienc. 2006 Dec; 78(4): 645-65.
140. Vincendeau P, Daulouède S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. J Immunol. 1991 Jun 15; 146(12): 4338-43.
141. Williams DJ, Taylor K, Newson J, Gichuki B, Naessens J. The role of anti-variable surface glycoprotein antibody responses in bovine trypanotolerance. Parasite Immunol. 1996 Apr; 18(4):209-18.
142. Witola WH, Lovelace CE. Demonstration of erythrophagocytosis in *Trypanosoma congolense*-infected goats. Vet Parasitol. 2001 Mar 20; 96(2):115-26.
143. Wolfram M, Ilg T, Mottram JC, Overath P. Antigen presentation by *Leishmania mexicana*-infected macrophages: activation of helper T cells specific for amastigote cysteine proteinases requires intracellular killing of the parasites. Eur J Immunol. 1995 Apr; 25(4): 1094-100.
144. Wong S, Kretsinger RH, Campbell DA. Identification of a new EF-hand superfamily member from *Trypanosoma brucei*. Mol Gen Genet. 1992 May; 233(1-2): 225-30.
145. Wrightsman RA, Luhrs KA, Fouts D, Manning JE. Paraflagellar rod protein-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes target *Trypanosoma cruzi*-infected host cells. Parasite Immunol. 2002 Aug; 24(8): 401-12.
146. Xiao G, Chung TF, Fine RE, Johnson RJ. Calreticulin is transported to the surface of NG108-15 cells where it forms surface patches and is partially degraded in an acidic compartment. J Neurosci Res. 1999 Dec 1; 58(5): 652-62.
147. Xu C, Ray DS. Isolation of proteins associated with kinetoplast DNA networks in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Mar 1; 90(5): 1786-9.
148. Yarlett N, Bacchi CJ. Parasite polyamine metabolism: targets for chemotherapy. Biochem Soc Trans. 1994 Nov; 22(4): 875-9. Review

149. Yarlett N, Garofalo J, Goldberg B, Ciminelli MA, Ruggiero V, Sufrin JR, Bacchi CJ. S-adenosylmethionine synthetase in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Biochim Biophys Acta*. 1993 Mar 24; 1181(1): 68-76.
150. Zhu Q, Zelinka P, White T, Tanzer ML. Calreticulin-integrin bidirectional signaling complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 17; 232(2): 354-8.

ANNEXES - TABLE DES MATIERES

<u>ANNEXE 1 - RECOLTE DES TRYPANOSOMES SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE</u>	106
<u>TAMPON PS (PHOSPHATE SALINE)</u>	106
<u>TAMPON PSG (PHOSPHATE SALINE GLUCOSE)</u>	106
<u>PREPARATION DE LA DEAE CELLULOSE</u>	106
<u>TAMPON DE LYSE HEMATOCYTAIRE</u>	107
<u>ANNEXE 2 - PROTOCOLES DE PROTEOMIQUE</u>	108
<u>2.1. PRECIPITATION DES ECHANTILLONS</u>	108
<u>2.1.1. Précipitation à l'acétone</u>	108
<u>2.1.2. Précipitation au TCA</u>	108
<u>2.1.3. Précipitation à l'éthanol</u>	108
<u>2.2. ELECTROPHORÈSE 2D POUR SPECTROMÉTRIE DE MASSE</u>	109
<u>2.2.1. Introduction</u>	109
<u>2.2.2. IEF dépôt et migration</u>	109
<u>2.2.3. Nettoyage de l'IPGPHOR et des sarcophages</u>	111
<u>2.2.4. Equilibration / réduction / alkylation des strips</u>	111
<u>2.2.5. Deuxième dimension : préparation du gel, dépôt et migration</u>	112
<u>2.2.6. Fixation et coloration du gel</u>	114
<u>2.2.7. Séchage des gels</u>	116
	104

<u>2.3. ELECTROPHORÈSE 1D POUR SPECTROMÉTRIE DE MASSE</u>	117
<u>2.3.1. Préparation du gel</u>	117
<u>2.3.2. Dépôt et migration</u>	119
<u>2.3.3. Fixation et coloration bleu colloïdal kit fermentas du gel</u>	119
<u>2.4. RÉCUPÉRATION ET DIGESTION DES PROTÉINES</u>	119
<u>2.4.1. Excision et lavages</u>	120
<u>2.4.2. Optionnel : réduction / alkylation</u>	120
<u>2.4.3. Digestion (4°C)</u>	120
<u>2.4.4. Extraction (TA)</u>	121
<u>2.5. DESSALAGE SUR ZIP-TIP C18</u>	121
 <u>ANNEXE 3 - LISTE EXHAUSTIVE DES PROTEINES IDENTIFIEES ET CARACTERISEES A PARTIR</u>	
<u>DU SECRETOME DE <i>T. CONGOLENSIS</i></u>	123

ANNEXE 1 - RECOLTE DES TRYPANOSOMES SUR COLONNE DE DEAE-CELLULOSE

Ref. [Lanham SM, Godfrey DG](#) Isolation of salivarian trypanosomes from man and other mammals using DEAE-cellulose. Exp Parasitol. 1970 Dec; 28(3):521-34.

TAMPON PS (PHOSPHATE SALINE)

Na ₂ HPO ₄ *H ₂ O	13.48 g	40.44 g	53.92 g
NaH ₂ PO ₄ * 2H ₂ O	0.78 g	2.34 g	3.12 g
NaCl	4.25 g	12.75 g	17 g
QSP	1000 ml	3000 ml	4000 ml

TAMPON PSG (PHOSPHATE SALINE GLUCOSE)

PSG	Vol. PS	Vol.H ₂ O	% glucose	Force ionique
6 : 4	6	4	1	0.217
4 : 6	4	6	1	0.145

Ajuster le pH à 8.0 avec du H₃PO₄ (acide phosphorique) 1M

PREPARATION DE LA DEAE CELLULOSE

1. Mélanger délicatement 250 g de cellulose DE52 dans un bécher avec 1 litre de PS, le pH devrait atteindre 10.
2. Ajuster le pH à 8 en ajoutant délicatement une solution de H₃PO₄ à 5 % et laisser sédimenter la cellulose (30 – 60 min).
3. Enlever le surnageant et rajouter du PS en agitant doucement.
4. Répéter cette opération encore une fois.
5. Eliminer une partie du PS et transférer dans des flacons en verre pour stérilisation par autoclavage (120°/30 min).
6. Avant récolte, équilibrer avec du PSG 6 : 4 , 2 volume de tampon / 1 volume de cellulose.

TAMPON DE LYSE HEMATOCYTAIRE

Produit	Masse molaire (g / litre)	Molarité (M) ou concentration (%)	Quantité pour 1 litre (g ou ml)
NH ₄ Cl	54,49 g	0.15	8,17 g
EDTA	292,24 g	0.1	29,22 g
KHCO ₃	100,1 g	0.1 %	1 g
H ₂ O			QSP 1 litre

ANNEXE 2 - PROTOCOLES DE PROTEOMIQUE

Ce manuel technique regroupe les modes opératoires utilisés en biochimie protéomique sur la Plate-forme de Protéomique Fonctionnelle de Montpellier.

2.1. PRECIPITATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons protéiques doivent être dessalés si besoin pour la première dimension IEF ou pour les concentrer. Les culots sont souvent difficiles à voir, pour éviter d'aspirer les protéines lors des lavages, il faut veiller à placer les tubes toujours dans le même sens dans la centrifugeuse et à aspirer à l'opposé de l'emplacement du culot. Eviter de conserver les protéines dans le tampon IEF : les protéines précipitées peuvent être conservées à sec ou bien après re-suspension en tampon de dépôt Laemmli ou IEF à - 20°C.

Vérifier que la centrifugeuse soit à 4°C ; SUR GLACE

2.1.1. Précipitation à l'acétone

- Ajout de 4 vol. d'acétone à - 20°C à 1 vol de la solution de protéines (*70% final*)
- Vortex, - 20°C pendant 20 min à une nuit
- Centrifuger 25 à 45 min à 4°C entre 15 000 et 38 000 g
- Eliminer le surnageant
- Laver (sans resuspendre) avec 200 µl à 1 ml d'acétone - 20°C
- Vortex, centrifuger 10 à 15 min entre 15 000 g et 38 000 g à 4°C
- Refaire les trois étapes précédentes : 3 lavages en tout
- Eliminer le surnageant, sécher le culot 5 min au speed-vac ou à l'air

2.1.2. Précipitation au TCA

L'Acide trichloroacétique (TCA) est conservé au frigo à 4°C.

- Ajouter le TCA (10 % final) à l'échantillon (*20 à 100 µg de protéines totales*)
- 2h sur glace en vortexant de temps en temps
- Centrifuger à 38 000 g, 25 min, 4°C (*Biofuge Status, HEAREUS PROG6*)
- Eliminer le surnageant (*cône bleu + cône jaune*)
- Laver (sans re-suspendre) avec 300 µl à 1 ml de diethyl ether (*sous la sorbonne*)
- Centrifuger 38 000 g 10 min, 4°C
- Refaire les trois étapes précédentes : 3 lavages en tout
- Aspirer le S/N cônes bleu + jaune (*mouiller le cône pour éviter les gouttes*)
- Sécher le culot 5 min au speed vac ou à l'air

2.1.3. Précipitation à l'éthanol

- Ajout de 9 vol. d'éthanol 100 % (- 20°C) à un vol de la solution (10% final)
- Vortex, - 20°C pendant 20 min à une nuit
- Centrifuger 25 à 45 min à 4°C entre 15 000 et 38 000 g
- Eliminer le surnageant
- Laver (sans re-suspendre) avec 200 µl à 1 ml d'éthanol 90 % à - 20°C
- Vortex, centrifuger 10 à 15 min entre 15 000 g et 38 000 g à 4°C
- Refaire les trois étapes précédentes : 3 lavages en tout
- Eliminer le surnageant, sécher le culot 5 min au speed-vac ou à l'air

2.2. ELECTROPHORÈSE 2D POUR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

2.2.1. Introduction

L'électrophorèse bidimensionnelle permet la séparation des protéines d'un mélange en fonction de leur point isoélectrique (pI) et de leur poids moléculaire. La première séparation est réalisée par focalisation isoélectrique (IEF) sur un « strip IPG » (immobilized pH gradient). Le gradient de pH, linéaire ou non linéaire, du « strip IPG » est défini par des immobilines : groupes de pK définis qui sont liés par liaison covalente à l'acrylamide. La seconde séparation est effectuée sur un gel SDS-PAGE classique. Afin d'éviter toute contamination des échantillons par des protéines externes (type kératines) qui pourrait en masquer la / les protéine(s) d'intérêt en MALDI-TOF, il est nécessaire de manipuler avec des gants non talqués, du matériel et une surface propre et en dehors de tout courant d'air. Les produits spécifiques proviennent de la gamme Plus One (Pharmacia) et l'eau est soit de l'eau Braun, soit de l'eau MilliQ, le plastique des tubes Eppendorf doit être résistant à l'acétonitrile pour éviter les contaminations de PEG (PolyEthylèneGlycol).

2.2.2. IEF dépôt et migration

Le tampon de dépôt doit permettre la solubilisation, dénaturation et réduction de l'échantillon. En présence d'urée, ne pas chauffer à + de 40 °C pour éviter la formation de S-carboxymethyl (carbamylation des protéines et/ou des peptides). La concentration en sels de l'échantillon déposé ne doit pas être supérieure à 10 mM. Les quantités de protéines déposées varient entre 20 et 400 µg.

Note : les sarcophages sont dédiés : sans surcharge, avec surcharge : GST ou albumine/Ig (liquides biologiques)

Tampon de réhydratation :

Composants	Avec Thiourée	Au final	Sans Thiourée	Au final
Urée + One Amersham	16,8 g	7 M	12 g	8M
Thiourée Sigma	5,76 g	2M		

CHAPS + One Amersham	1,6 g	4 %	0,5 g	2 %
H ₂ O Braun		15 ml		16 ml

Chauffer à TA (37°C max) jusqu'à dissolution

Composants	Avec Thiourée	Au final	Sans Thiourée	Au final
IPG Buffer + One Amersham	800 µl	0,8 %		
Tergitol Sigma	80 µl	0,2 %		
DTT + One Amersham	616,8 mg	100 mM	44,8 mg	20 mM
Bleu de bromophénol Sigma	Traces		Traces	
H ₂ O Braun		40 ml		25 ml
DeStreak Reagent Amersham	125 µl *	0,5 % *	Extemporément ** 4,26 µl pour 350 µl	1,22% **

*: Mettre 500 µl d'IPG buffer (soit 2 % final) pour les gammes de pH autres que 7-11 NL et 3-11 NL

** : Utile pour les gammes de pH basiques et les larges gammes (3-10 / 3-11). Attention pour être efficace il ne doit pas y avoir trop de DTT dans le tampon (20 mM)

Aliquoter en 1,5 ml à - 20°C. Peut se recongeler une fois, ne pas chauffer à + de 37°C.

- Décongeler le tampon de réhydratation à température ambiante
- Reprendre chaque culot d'échantillon avec 350 µl de tampon de réhydratation complet
- Vortexer, attendre 5-15 min, vortexer, centrifuger (*Vérifier que le culot soit bien dissout*)
- Déposer uniformément l'échantillon entre les deux électrodes avec un cône jaune
- Attention à ne pas faire de bulles*
- Prendre le strip (conservés à -20°C) par le bord négatif (à l'opposé du +)
- Le tenir avec une pince et décoller le film protecteur du gel
- Déposer ensuite le strip dans le sarcophage face gel sur l'échantillon en mettant d'abord le côté + du strip dans la pointe du sarcophage.
- Aller délicatement jusqu'à la cathode, enlever les bulles si besoin
- Vérifier que les deux électrodes sont bien en contact avec le gel (*pousser si besoin vers le +*)
- Recouvrir le strip avec de l'huile IPG Cover Fluid (Pharmacia) vol max 800 µl
- Placer le couvercle du sarcophage en plaçant les ergots au-dessus des électrodes afin de maintenir le contact gel/électrode
- Déposer les sarcophages sur l'IPGphor côté pointu sur l'anode (+) et côté franc sur la cathode (-)
- Noter soigneusement les références du strip et du sarcophage pour chaque échantillon.
- Fermer le couvercle de l'appareil et lancer le programme (n°2 ou n°4) :
 - 10 à 12 h de réhydratation à 20°C
 - IEF 20°C 50 µA max.

- STEP 1 : Gradient jusqu'à 300 V en 5 min
- STEP 2 : Step-n-hold 300 V, 30 min
- STEP 3 : Gradient jusqu'à 5000 V en 3 h
- STEP 4 : Step-n-hold 5 000 V, jusqu'à 60 000 Vh
- STEP 5 : Step-n-hold 300 V, 20 h

Note : l'ampérage diminue de 50 à 30 μ A environ au cours de la focalisation. En fin de migration le gel est jaune marron à la cathode et bleu à l'anode. Le Vh de l'avant dernière étape peut être optimisé en fonction des échantillons.

- Sortir le strip du sarcophage avec une pince
 - L'essuyer côté film sur du whatman imbibé d'H₂O MilliQ
 - Placer ensuite chaque strip dans une rainure du support
- Les strips peuvent être conservés à -80°C quelques mois*

2.2.3. Nettoyage de l'IPGPHOR et des sarcophages

- Essuyer l'IPGphor avec du papier absorbant (*électrodes + caoutchouc du couvercle*)
- Nettoyer avec du papier imbibé d'eau milliQ et sécher
- Essuyer soigneusement les sarcophages et leurs couvercles avec du papier absorbant en faisant attention aux électrodes.
- Mettre du savon pur (*Spécial sarcophages*) et frotter avec une brosse à dent
- Attendre 10 min puis agiter quelques heures en rajoutant de l'eau MilliQ
- Rincer 3-4 fois 1 à 2 h à l'eau MilliQ
- Sécher sur l'envers

2.2.4. Equilibration / réduction / alkylation des strips

Les strips doivent être équilibrés dans du tampon SDS-Tris-Urée pour la deuxième dimension. Une réduction-alkylation des groupements sulfhydryl (SH) des protéines évite leur ré-oxydation aléatoire pendant la deuxième dimension.

- Tampon d'équilibration SDS pH 8.8 :
 - 6,65 ml Tris HCl 1,5 M pH 8.8 (*50 mM final*)
 - 72,07 g Urée + One (*6 M final*)
 - 69 ml Glycérol + One 87 % v/v (*30 % final*)
 - 4 g SDS (*2% final*)
 - Dissolution avec 40 ml H₂O BRAUN
 - qsp 200ml H₂O BRAUN
 - Traces Bleu de Bromophénol
- Tampon d'équilibration SDS pH 6.8 :
 - 10 ml Tris HCl 1 M pH 6.8 (*50 mM final*)
 - 72,07 g Urée + One (*6 M final*)
 - 69 ml Glycérol + One 87 % v/v (*30 % final*)
 - - 4 g SDS (*2% final*)
 - - Dissolution avec 40 ml H₂O BRAUN

- qsp 200ml H₂O BRAUN
- Traces Bleu de Bromophénol

Notes : Aliquoter les tampons par 25 ml à - 20°C. Peuvent se recongeler une fois, ne pas chauffer à + de 37°C. Pour préparer les solutions suivantes: peser les poudres et ajuster le volume de tampon nécessaire.

- Tampon de réduction (*extemporanément*) :
 - 20 ml Tampon d'équilibration SDS pH 6.8
 - 200 mg DTT sans spatule (*65 mM final*)
- Tampon d'alkylation (*extemporanément*) :
 - 20 ml Tampon d'équilibration SDS pH 8.8
 - 300 mg Iodoacétamide sans spatule (*81 mM final*)

- 3 ml de tampon de réduction par rainure
- 10 min à TA sous agitation
- Essuyer le strip sur du wathman humide, le placer dans une rainure propre
- 3 ml de tampon d'alkylation par rainure
- 15 min à TA sous agitation
- Essuyer le strip sur du wathman humide, le placer dans une rainure propre
- 3 ml de tampon d'équilibration pH 6.8 par rainure
- 5 min à TA sous agitation
- Essuyer le strip sur du wathman humide
- déposer sur gel SDS-PAGE ou congeler à -80 °C

2.2.5. Deuxième dimension : préparation du gel, dépôt et migration

2.2.5.1. Préparation du gel

Le gel doit polymériser de préférence une nuit. La quantité d'ammonium persulfate ajoutée pour la polymérisation doit être 5X inférieure à celle couramment utilisée pour faciliter l'extraction des peptides après digestion par la trypsine. Les gels seront donc coulés au moins la veille et conservés à 4°C. Travailler sur du papier absorbant, avec des gants non talqués. Passer à l'alcool à 95° tout ce qui sera en contact avec le gel : plaques et espaceurs.

- Déposer un filet continu de vaseline (*seringue + cône*) sur le bord des plaques (*côtés & bas*)
- Sur la grande plaque, placer les espaceurs du bas sur ce filet
- Placer ensuite ceux des côtés en les faisant glisser un peu vers le bas pour "joindre" avec l'espaceur du bas
- Déposer la petite plaque par-dessus
- Fixer l'ensemble avec des pinces (*3 en bas et 1 de chaque côté*)
- Vérifier la continuité du joint de vaseline au niveau des espaceurs
- Vérifier que la vaseline ne déborde pas sur l'emplacement du gel
- Placer l'ensemble verticalement et pousser vers le bas sur les espaceurs des côtés.
 - Tampon Tris-HCl 1,5 M, pH 8.8
 - 90,8 g Tris Pharmacia + One
 - 400 ml H₂O BRAUN filtrée, à température ambiante

- Ajuster à pH 8,8 avec HCl 37% (11 ml) vérifier 10min après
- qsp 500 ml H₂O BRAUN

Composants	Concentration finale / 50ml	Gamme Pharmacia Plus One (<i>pour la spectrométrie de masse</i>) volumes en ml						
		10 %	11 %	12%	15 %	16%	17 %	18 %
H ₂ O	qsp 50 ml	21,1	19,5 2	17,94	13,2	11,62	10,04	8,46
Tris 1,5 M pH 8.8	375 mM							
Acrylamide 40 %		12,5	13,7 5	15	18,75	20	21,25	22,5
Bisacrylamide 2 %	Acryl/Bis 75,75/1	3,3	3,63	3,96	4,95	5,28	5,61	5,94
SDS 10 %	0,1 %	0,5						
APS 100 mg/ml*	140 µg/ml	70 µl						
TEMED 100 %*	0,05 %	25 µl						

*Au dernier moment

Pour un grand gel (deux strips) en gradient : 50 ml de chaque %

Pour un grand gel (deux strips) uniforme : 75 ml

Pour deux grands gels (quatre strips) en gradient : 100 ml de chaque %.

Pour deux grands gels (quatre strips) uniformes : 150 ml

- Préparer le gel selon les besoins suivant le tableau précédent, bien mélanger
- Couler le gel bien au centre avec une pipette de 25 ml jusqu'en haut
- Couvrir avec 3 ml d'isopropanol
- Contrôler l'absence de fuites, le gel polymérise entre 45 min et 2 h à TA
- Laver l'isopropanol 3 fois avec de l'eau MilliQ
- Couvrir avec de l'eau MilliQ et stoker à 4°C

3.2.5.2. DEPOT

Mettre le gel à TA et l'agarose à chauffer au bain-marie. Prévoir 2,5 l pour 2 plaques ou 2 l pour 1 plaque de tampon de migration 1X.

- Tampon de migration 10 X :
 - 120 g Tris base (25 mM 1X final)
 - 576 g Glycine (195 mM 1X final)
 - 40 g SDS (0,1 % 1X final)
 - qsp 4 l H₂O milliQ
- Agarose sealing solution :
 - 1 g Agarose Low Melting (1 % p/v final)
 - 2 ml SDS 10 % (0,2 % v/v final)

- 15 ml Tris 1M pH 6.8 (150 mM final)
- qsp 100 ml H₂O milliQ
-
- Chauffer à 60 °C jusqu'à dissolution et avant chaque utilisation
- Éliminer l'eau, repérer le milieu du gel et enlever les pinces de côté
- Mettre du tampon de migration sur le verre au-dessus du gel
- Couper les extrémités des strips réduits/alkylés à l'extérieur des traces des électrodes
- Attraper le strip avec des pinces propres, face gel vers soi
- L'immerger dans du tampon de migration 1X
- Faire adhérer le film plastique du strip sur la grande plaque du gel le plus près possible de la petite plaque en plaçant les côtés + vers l'extérieur des gels
- Faire ensuite glisser le strip le long de la grande plaque jusqu'au fond du puits à l'aide des plaques vertes et éventuellement de spatules
- Éliminer les bulles puis le tampon de migration 1X
- Couler 1 à 2 ml d'Agarose sealing solution refroidie à 40°C pour couvrir le strip
- Contrôler que le strip soit en contact avec le gel d'acrylamide
- Éliminer les bulles
- Enlever l'espaceur du bas du gel quand l'agarose est pris
- Avec une spatule éliminer la vaseline du bas des plaques
- Placer le(s) gel(s) dans la cuve avec 500 ml de tampon de migration 1X en bas
- Avec une aiguille recourbée, éliminer les bulles placées en bas du gel
- Remplir le réservoir du haut de la cuve et brancher

2.2.5.3. Migration

Commencer la migration à 40V (45 mA par plaque) jusqu'à ce que le front de migration soit à +/- 1,5 cm du haut du gel (30 à 45 min). Faire ensuite migrer à 45 mA par plaque (300V) pendant 5-6h en fonction du % du gel. Pendant la migration l'ampérage doit diminuer jusqu'à environ 15 mA par gel et le voltage augmenter de 100 à 300 V. Pour un grand gel Bio Rad 5 à 7 mA ON ou 300 V 5h. Après la migration, couper les gels au milieu avec la règle et faire une encoche côté + du strip.

2.2.6. Fixation et coloration du gel

Utiliser une boîte hermétique propre (attention aux contaminations protéiques) pour fixer et colorer les gels, toujours les manipuler avec des gants sans talc, lavés à l'eau déminéralisée. Identifier les boîtes de coloration pour chacun des gels. Préparer l'eau MilliQ et peser les poudres pour les différentes solutions pendant la migration du gel (mettre au dernier moment l'éthanol et les poudres à dissoudre). Prévoir 250 ml de chaque solution par gel (1strip).

*Note * : à préparer extemporanément*

2.2.6.1. Fixation et Coloration à l'argent

- Solution F 1 de fixation :
 - 450 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectpur (50 % Final)
 - 50 ml Acide Acétique Normapur (5 % final)

- Solution F2 de fixation :
 - 500 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectapur (50 % Final)

- *Thiosulfate sodium 10% :
 - 200 mg Thiosulfate de sodium (100 mg/ml final)
 - 2 ml H₂O milliQ (ajuster le volume en fonction de la pesée)

- Solution TS , mordantage :
 - - 2 ml Thiosulfate de sodium 10% (0,02 % final)
 - - 1l H₂O milliQ

- *Nitrate d'argent 50% :
 - 1 g NO₃Ag (500 mg/ml final)
 - 2 ml H₂O milliQ (ajuster le volume en fonction de la pesée)

- Solution Ag de coloration :
 - 2 ml NO₃Ag 50% (0,1 % final)
 - 1l H₂O milliQ

- Solution c Na de révélation :
 - 40 g Carbonate de Sodium (2 % final)
 - * 2,16 ml Formaldéhyde 37 % (0,04 % final)
 - 2 l H₂O milliQ

- Solution Ac 5% d'arrêt :
 - 50 ml Acide Acétique Normapur (5 % final)
 - 950 ml H₂O milliQ

- Solution Ac 1% conservat° :
 - 10 ml Acide Acétique Normapur (1 % final)
 - 990 ml H₂O milliQ

- Fixer 20 min avec la Solution F1
- Laver 10 min avec la Solution F2
- 1 lavage de 10 min H₂O milliQ
- Mordancer 1 min avec la Solution TS
- 2 lavages de 1 min H₂O milliQ
- Colorer 20 min avec la Solution Ag à 4°C

- 2 lavages rapides à H₂O milliQ (3 à 20 s max)
- Révéler rapidement (virage au jaune) avec la Solution CNa, jeter ce 1^{er} bain
- 2^{ème} bain avec la Solution CNa, suivre le temps de la révélation
- Arrêter avec la Solution Ac 5% 30 min
- Conserver le gel à 4°C dans la Solution Ac 1%
- Scanner le gel

Note : Nettoyer immédiatement après usage les instruments et les récipients au savon puis les rincer à l'eau, eau déminéralisée et laisser sécher à l'air sur du papier absorbant avant de ranger.

2.2.6.2. Fixation et coloration Bleu Colloïdal Kit Fermentas du gel

- Solution F 1 de fixation :
 - 450 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectpur (50 % Final)
 - 50 ml Acide Acétique Normapur (5 % final)
- Solution F2 de fixation :
 - 500 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectpur (50 % Final)
- Fixer 20 min avec la Solution F1
- Laver 10 min avec la Solution F2
- 3 lavages de 5 min H₂O milliQ
- Mélanger doucement par retournement la solution PageBlue (Fermentas)
- Ajouter 20 ml (mini gel) ou 100 ml (grand gel)
- Incuber 1h à ON à TA avec agitation balancelle (pas en rotation)
- 1 à 4 lavages de 5 min H₂O milliQ

2.2.6.3. Fixation et Coloration au ProQ Diamond

- Fixer le gel à l'Acide Acétique 5%- Ethanol 50% 20 min
- Laver le gel à l'Ethanol 50% 20 min
- Laver le gel à l'H₂O MQ 20 min
- Colorer le gel avec la solution ProQ Diamond diluée au 1/3 dans l'H₂O MilliQ
- Incuber sur la nuit
 - Solution de décoloration :
 - 50ml Acétate pH 7,4
 - 200ml d'Acétonitrile
 - 750ml d'H₂O MQ
- Décolorer le gel : 3 bains de 30 min de solution de décoloration
- Laver 2 fois 5 min à l'H₂O MQ
- Scanner sur un scanner à 580 nm (Typhoon)

2.2.7. Séchage des gels

- Tampon de conservation gels colorés à l'argent :
 - 185 ml Ethanol 95° (35% final)
 - 10 ml Glycérol (2 % final)
 - 305 ml H₂O milliQ
 - Tampon de conservation gels colorés au bleu :
 - 150 ml Glycérol (30 % final)
 - qsp 500 ml H₂O milliQ
- Placer les gels 2h sous agitation dans le tampon de conservation
 - Mettre le cadre inférieur sur le porte-cadre
 - Mouiller les feuilles de cellophane avec le tampon de conservation
 - Placer sur le support : une feuille, le gel puis une seconde feuille
 - Chasser les bulles
 - Placer le cadre supérieur avec le joint (« TOP » en face de celui du cadre inférieur)
 - Sortir les cadres et tourner les vis blanches d'un quart de tour vers l'intérieur
 - Mettre dans le sécheur une nuit sur ventilation sans chauffage
 - Récupérer les gels secs
 - Laver les cadres (eau, détergent, eau, eau déminéralisée puis milliQ)

2.3. ELECTROPHORÈSE 1D POUR SPECTROMÉTRIE DE MASSE

Travailler avec des gants et du matériel propre pour éviter toute contamination (kératine notamment). Réaliser toutes les préparations de solutions avec de l'eau Ultrapure (aqua B. Braun), excepté le tampon de migration avec de l'eau milliQ. Le plastique des tubes Eppendorf doit être résistant à l'acétonitrile pour éviter les contaminations de PEG (PolyEthylèneGlycol).

2.3.1. Préparation du gel

- Tris 1,5M pH 8,8 :
 - 90,8 g Tris Base
 - 400 ml H₂O Braun à température ambiante
- ajuster à pH 8,8 avec environ 15 ml d'HCl 37 %
- vérifier le pH après 10 min
- qsp 500 ml H₂O Braun
- Tris 1M pH 6,8 :
 - 30,29 g Tris Base
 - 150 ml H₂O Braun à température ambiante
- ajuster à pH 6,8 avec environ 15 ml d'HCl 37 %
- vérifier le pH après 10 min
- qsp 250 ml H₂O Braun

- Laemmlli 4X :
 - 5 ml Tris 1M pH 6,8 (250 mM final dans le 4X)
 - 1,6 g SDS (8 % final dans le 4X)
 - 9,2 ml glycérol 87 % (40 % final dans le 4X)
 - 4 ml β mercaptoethanol (14,3 mol/l) (20 % v/v final dans le 4X)
 - traces de Bleu de Bromophénol
 - qsp 20 ml H₂O Braun

- Laver les plaques à l'EtOH
- Réaliser le montage (*épaisseur 0,75 mm*)
- Sceller les plaques avec de l'Agarose 1% (*Vérifier les fuites en remplissant avec de l'eau ultrapure*)
- Couler un gel au pourcentage voulu comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Composants	Concentration finale /30ml	Gamme pharmacia Plus one (volume en ml)						
		10%	11%	12%	15%	16%	17%	18%
H2O	qsp 30 ml	12,66	11,71	10,76	7,92	6,97	6,02	5,07
Tris 1,5 M pH 8.8	375 mM							
Acryl. 40%		7,5	8,25	9	11,25	12	12,75	13,5
Bisacryl 2%	Acryl/Bisacryl 75,75/1	1,98	2,18	2,37	2,97	3,17	3,36	3,56
SDS 10%	0,1%	300 µl						
APS 100 mg/ml	140 µg/m	42 µl						
TEMED 100%	0,05%	15 µl						

- Ajouter de l'isopropanol pour faire le niveau
- Laisser sécher de 45 min. à 1h
- Enlever l'isopropanol et bien rincer à la pissette d'eau milliQ la pellicule qui s'est formée
- Couler le stacking (5%) préparé comme indiqué dans le tableau ci-dessous :

Composants	Concentration finale /15ml	Volume en ml
H2O	qsp 15 ml	9,94
Tris 1M pH 6.8	125 mM	1,875
Acryl. 40%	125 mM	1,875
Bisacryl. 2%	Acryl/Bisacryl 37,5/1	0,99
SDS 10%	0,1%	150 µl
APS 100 mg/ml	1 mg/ml	150 µL
TEMED 100%	0,1%	15 µL

- Laisser polymériser avec le peigne

- Envelopper de Saran
- Conserver à 4°C en chambre froide minimum 12 h

2.3.2. Dépôt et migration

- Reprendre les échantillons dans le Laemmli
- Chauffer les échantillons 3-5 min à 95°C et déposer
- Laisser migrer à 25 mA le temps de faire entrer les échantillons dans le stacking puis à 7 mA sur la nuit ou à 30-35 mA (5h) en tampon de migration 1X

Tampon de migration 10 X :

- 120 g Tris base (*25 mM 1X final*)
- 576 g Glycine (*195 mM 1X final*)
- 40 g SDS (*0,1 % 1X final*)
- qsp 4 l H₂O milliQ

2.3.3. Fixation et coloration bleu colloïdal kit fermentas du gel

- Solution F 1 de fixation :
 - 450 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectpur (*50 % Final*)
 - 50 ml Acide Acétique Normapur (*5 % final*)
 - Solution F 2 de fixation :
 - 500 ml H₂O milliQ
 - 500 ml Ethanol Absolu Rectpur (*50 % Final*)
- Fixer 20 min avec la Solution F1
- Laver 10 min avec la Solution F2
- 3 lavages de 5 min H₂O milliQ
- Mélanger doucement par retournement la solution PageBlue (*Fermentas*)
- Ajouter 20 ml (*mini gel*) ou 100 ml (*grand gel*)
- Incuber 1h à ON à TA avec agitation balancelle (*pas en rotation*)
- 1 à 4 lavages de 5 min H₂O milliQ

2.4. RÉCUPÉRATION ET DIGESTION DES PROTÉINES

Travailler sous hotte, sur une surface propre avec du matériel stérile ou bien propre (eau milliQ + alcool). L'acétonitrile (ACN), très volatile, est aliquoté en fonction des besoins dans de petites fioles de verre à l'abri de la lumière. Utiliser des cônes à filtres. Les tampons doivent être préparés depuis peu du fait de leur forte volatilité :

- ACN : Acétonitrile 100 %
- NH₄ : NH₄HCO₃ 100 mM 315 mg qsp 40 ml H₂O BRAUN
- Ac F : Acide formique 5 % (v/v) préparé extemporanément

- Coloration au bleu : 50% ACN, 50 mM NH_4HCO_3

2.5.1. Excision et lavages

- Allumer le speed vac.
- Travailler avec environ 50 μl pour les spots 2D et 200 à 500 μl pour les bandes 1D
- Exciser les spots d'intérêt (+ blanc) avec un cône coupé en fonction de la taille du spot et les bandes 1D d'intérêt au scalpel sur une plaque de verre (« masse »)
- Hydrater régulièrement à l' H_2O MilliQ le gel au cours de l'excision
 - Couper le gel en morceaux avec le scalpel et le placer dans un Eppendorf de 0,5 ml.
- Gels colorés à l'Ag : 2 lavages de 10 min H_2O milliQ
- Gel colorés au Bleu : 2 à 4 lavages de 10 min avec 50% ACN, 50 mM NH_4HCO_3 , éliminer le surnageant à chaque fois jusqu'à décoloration complète.
- Déshydratation 10 min avec ACN, éliminer le surnageant
- Réhydrater 10 min avec NH_4
- Ajouter un volume identique de ACN 10 min, éliminer le surnageant
- Speed vac 3 min (5 min max.) sauf si Réduction/Alkylation ensuite

2.4.2. Optionnel : réduction / alkylation

Tampons :

- DTT 100 mM : 15,4 mg/ml
- Iodoacétamide 55 mM : 10,1 mg/ml
- Allumer le speed vac.
- Travailler avec environ 50 μl pour les spots 2D et 200 à 500 μl pour les bandes 1D
- Incuber 45 min à 56°C avec 10 mM DTT in 100 mM NH_4HCO_3
- Travailler ensuite à RT, éliminer le surnageant
- Déshydratation 10 min avec ACN, éliminer le surnageant
- Incuber 30 min à RT et à l'obscurité dans 55 mM Iodoacétamide in 100 mM NH_4HCO_3
- Déshydratation 10 min avec ACN, éliminer le surnageant
- Réhydrater 10 min avec NH_4
- Ajouter un volume identique de ACN 10 min, éliminer le surnageant
- Speed vac 3 min (5 min max.)

2.4.3. Digestion (4°C)

Tampon de digestion (extemporanément) :

- 400 μl (spots bleu) ou 600 μl (spots Ag) de NH_4HCO_3 100 mM
- 6 μl Trypsine (GOLD 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 50 mM acide acétique) aliquotée à - 80°C.
- Réhydrater le gel avec 10 à 20 μl (spot 2D) ou 50 à 200 μl (bande 1D) de tampon de digestion 45 min sur glace
- Ajouter un volume suffisant de NH_4HCO_3 100 mM pour bien recouvrir les morceaux de gel

- Incuber une nuit à 25 °C

2.4.4. Extraction (TA)

Utiliser toujours le même cône pour récupérer les peptides d'un même échantillon. Volume de tampon pour chaque étape : 10 à 20 µl (*spot 2D*) ou 50 à 200 µl (*bande 1D*). Tous les surnageants sont récupérés dans le même tube (*1,5 ml polypropylène opaque*).

- Récupérer le surnageant de digestion
- Ajouter ACN 10 min, récupérer le surnageant
- Ajouter NH₄ 10 min, ajouter 1 à 2 volumes d'ACN 10 min, récupérer le surnageant
- Ajouter Ac F 10 min, ajouter 1 à 2 volumes d'ACN 10 min, récupérer le surnageant
- Refaire l'étape précédente
- Sécher les peptides récupérés 1 à 3 h au speed vac (*1h pour 20 tubes de 120 µl*)

2.5. DESSALAGE SUR ZIP-TIP C18

2.5.1. Matériels et solutions nécessaires

- Zip-TIP C18 (Millipore)
- Acide formique 100% (Merck)
- Acétonitrile qualité HPLC (VWR)
- TFA Uvasol (Merck)

2.5.2. Solutions à préparer (volume final 20ml)

- TFA 10% : 18 ml d'eau milliQ + 2ml de TFA 100%
- TFA 0.1% : 19,8 ml d'eau milliQ + 200 µl de TFA 10%
- Acide formique 2% : 19,6 ml d'eau milliQ + 400 µl d'acide formique 100%
- Acétonitrile/Eau milliQ/TFA 50/50/0.1% : 10ml d'Acétonitrile + 10 ml d'eau milliQ + 200 µl de TFA 10%

L'acétonitrile s'évaporant très rapidement, les solutions sont à préparer tous les 15 jours.

2.5.3. Reprise des échantillons

- Reprise échantillon dans le tube de départ avec 10 µl Acide formique 2%.
 - Laisser en agitation douce, 15 min et passer à la préparation de la colonne.
- Si vous utiliser un vortex, passer un coup de centrifugeuse de pailasse avant la suite*

2.5.4. Préparation de la colonne

La colonne ne doit jamais rester à sec.

- Mouiller la colonne en prenant 10 µl ACN/Eau milliQ 50/50.
- Puis éliminer dans la poubelle.

- Equilibrer la colonne en prenant 10 μ l TFA 0.1%.
- Puis éliminer dans la poubelle.

En cas de besoin vous pouvez vous arrêter, et uniquement à cette étape, en prenant soin de remplir le zip tip avec 10 μ l de TFA 0.1%

2.5.5. Fixation des peptides, lavage et élution

- Fixer les peptides du tube de départ par 5 allers-retours dans la solution de reprise.
Conserver le liquide dans le tube de départ.
- Laver la colonne en prenant 10 μ l TFA 0.1 %.
- Puis éliminer dans le tube de départ.
- Eluer dans un nouveau tube avec 10 μ l ACN/Eau milliQ/TFA 50/50/0.1% par 5 aller/retour du même liquide.

**ANNEXE 3 - LISTE EXHAUSTIVE DES PROTEINES IDENTIFIEES ET
CARACTERISEES A PARTIR DU SECRETOME DE T. CONGOLENE**

N° bande	Code TbDB	Entrée SwissProt/TrEMBL	Masse	Score	Peptide match	Identification
1	Tb09.211.4430	Q38D68_9TRYP	149240	37	5	Helicase, putative
1	Tb11.02.0110	Q386Q9_9TRYP	145687	31	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
1	Tb11.01.2290	Q383M7_9TRYP	139201	46	4	Protein kinase, putative
1	Tb11.01.8820	Q380Y3_9TRYP	137486	30	3	Expression site-associated gene (ESAG) protein, putative
1	Tb09.211.3610	Q38DE8_9TRYP	134655	55	5	Ubiquitin-activating enzyme E1, putative
1	Tb09.211.2790	Q38DM6_9TRYP	134140	30	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
1	Tb927.7.4080	Q57UN8_9TRYP	125719	30	1	DNA excision repair protein, putative
1	Tb927.7.5370	Q582F2_9TRYP	122881	31	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
1	Tb927.3.5520	Q580S3_9TRYP	99898	52	3	26S proteasome regulatory non-ATPase subunit
1	Tb927.2.100	Q584N8_9TRYP	94933	51	2	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
1	Tb927.1.180	Q8IFI2_9TRYP	94489	52	2	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
1	Tb10.389.0880	Q388X2_9TRYP	90864	54	2	Heat shock protein, putative
1	Tb927.7.6090	Q57VK2_9TRYP	88163	47	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
1	Tb927.3.4680	Q582R7_9TRYP	49397	39	1	RAB GDP dissociation inhibitor alpha, putative
2	Tb927.7.3550	Q57WHO_9TRYP	138164	100	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb11.01.7010	Q381P8_9TRYP	117883	247	6	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb927.4.2140	Q584H3_9TRYP	114765	44	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb11.02.0830	Q386H8_9TRYP	112938	34	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb10.389.0560	Q388V1_9TRYP	109168	30	4	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb10.61.1750	Q388B7_9TRYP	90801	47	1	C-terminal motor kinesin, putative
2	Tb11.55.0006	Q386Y0_9TRYP	89755	45	2	Intraflagellar transport protein IFT88, putative
2	Tb927.2.240	Q586L3_9TRYP	85214	39	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
2	Tb927.2.240	Q584N4_9TRYP	76707	39	1	Retrotransposon hot spot (RHS) protein, putative
3	Tb927.7.7300	Q57TW7_9TRYP	108787	31	1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
3	Tb927.8.2870	Q57W85_9TRYP	107126	30	3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
3	Tb927.4.2080	Q583I5_9TRYP	104883	50	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
3	Tb927.7.7160	Q57XT6_9TRYP	102207	31	2	Dual specificity protein phosphatase, putative
5	Tb09.160.1180	Q38FR8_9TRYP	66257	46	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
5	Tb927.4.1850	Q6PW20_9TRYP	64384	51	2	Signal recognition particle protein SRP68
5	Tb09.211.0930	Q38E63_9TRYP	63029	49	2	Polyadenylate-binding protein 1, putative
5	Tb927.5.2940	Q57ZX0_9TRYP	62328	47	2	Stress-induced protein sti1, putative
5	Tb10.70.0280	Q38AV5_9TRYP	59503	47	2	Chaperonin Hsp60, mitochondrial
5	Tb10.70.7050	Q38CD4_9TRYP	58362	31	2	T-complex protein 1, delta subunit, putative
5	Tb11.01.8510	Q381B0_9TRYP	54624	48	2	T-complex protein 1, alpha subunit, putative
5	Tb11.02.0210	Q386P9_9TRYP	50887	37	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
5	Tb10.70.3360	Q38BK6_9TRYP	29422	31	1	40S ribosomal protein S3a, putative

6	Tb11.02.5450	Q384Q5_9TRYP	71435	294	8	Glucose-regulated protein 78, putative
6	Tb927.5.360	Q57VX7_9TRYP	58226	39	1	75 kDa invariant surface glycoprotein
6	Tb11.42.0003	Q386W9_9TRYP	58058	52	2	T-complex protein 1, beta subunit, putative
6	Tb927.6.5070	Q586H9_9TRYP	51821	37	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
6	Tb10.70.5650	Q38C32_9TRYP	49106	46	2	Elongation factor 1-alpha
6	Tb927.4.5010	Q584K4_9TRYP	45043	100	3	Calreticulin, putative
6	Tb10.61.2680	Q388I8_9TRYP	38453	56	2	Pyruvate kinase 1
7	Tb11.02.0100	Q386R0_9TRYP	57683	45	2	Carboxypeptidase, putative
7	Tb927.7.1060	Q57VV2_9TRYP	53733	31	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
7	Tb11.02.0290	Q386P1_9TRYP	53097	39	2	Succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial, putative
7	Tb11.01.0870	Q384B5_9TRYP	52332	51	2	Replication factor A, 51kDa subunit, putative
7	Tb927.4.1270	Q581V4_9TRYP	49905	47	3	RuvB-like DNA helicase, putative
7	Tb11.02.1220	Q386D8_9TRYP	48929	45	2	Proteasome regulatory ATPase subunit 2
8	Tb09.211.4240	Q38D86_9TRYP	48172	47	2	Phosphoinositide-binding protein, putative
8	Tb927.2.5160	Q585V4_9TRYP	44814	47	2	Chaperone protein DnaJ, putative
8	Tb09.160.5400	Q38EL2_9TRYP	28272	45	2	Expression site-associated gene 9 (ESAG9) protein, putative
9	Tb927.4.4050	Q57Y09_9TRYP	76050	52	2	ABC transporter, putative
9	Tb927.4.1300	Q581V1_9TRYP	42015	47	3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
9	Tb10.70.5360	Q9N9G6_9TRYP	37660	51	2	La protein
10	Tb09.211.1320	Q38E23_9TRYP	163285	45	1	AMP deaminase, putative
10	Tb09.211.4890	Q963F4_9TRYP	41017	90	2	Protein kinase CK2 alpha
10	Tb10.61.1960	Q388D3_9TRYP	28642	51	2	40S ribosomal protein S2, putative
10	Tb11.01.2560	Q383K0_9TRYP	27610	45	1	40S ribosomal protein SA, putative
10	Tb927.36.3310	Q57V55_9TRYP	26639	47	2	60S ribosomal protein L13, putative
10	Tb927.4.1890	Q583K4_9TRYP	26433	45	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
10	Tb927.4.2030	Q583J0_9TRYP	22704	45	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
10	Tb09.211.0120	Q38EE8_9TRYP	20130	39	1	Nascent polypeptide associated complex subunit, putative
11	Tb927.5.4110	Q57Z38_9TRYP	95729	29	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
11	Tb927.4.590	Q57ZY7_9TRYP	88025	38	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
11	Tb927.5.1640	Q57V99_9TRYP	73716	32	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
11	Tb927.6.3640	Q585W2_9TRYP	62902	29	4	<i>Putative uncharacterized protein</i>
11	Tb09.160.4560	Q38EV2_9TRYP	44716	67	2	Arginine kinase
11	Tb927.4.310	Q583Y7_9TRYP	39022	32	3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
11	Tb927.8.3530	Q57YW0_9TRYP	37805	328	9	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+], glycosomal
11	Tb927.7.3380	Q57WF3_9TRYP	32854	31	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
12	Tb11.01.3040	Q383F3_9TRYP	35151	96	2	Cytosolic malate dehydrogenase, putative
13	Tb927.4.5320	Q580Q3_9TRYP	97120	39	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
13	Tb10.70.2650	Q38BE4_9TRYP	94334	236	6	Elongation factor 2
13	Tb10.406.0610	Q389U4_9TRYP	62877	26	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
13	Tb927.7.1300	Q57WS0_9TRYP	41940	53	1	Protein disulfide isomerase, putative
13	Tb09.160.3710	Q38F34_9TRYP	32315	74	1	Proliferating cell nuclear antigen
14	Tb11.01.5860	Q382B2_9TRYP	59381	32	1	T-complex protein 1, epsilon subunit, putative
14	Tb927.7.4420	Q57X58_9TRYP	32154	49	1	Proteasome subunit alpha type
14	Tb09.160.4250	Q71RY2_9TRYP	22425	54	1	Tryparedoxin peroxidase
15	Tb927.3.4280	Q580L4_9TRYP	81115	37	2	Mismatch repair protein MSH5, putative
15	Tb09.211.2180	Q38DT9_9TRYP	72218	30	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
15	Tb927.5.3010	Q57ZX7_9TRYP	57749	30	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>

15	Tb10.61.0540	Q387T8_9TRYP	36412	61	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
15	Tb11.02.3210	Q385L6_9TRYP	26819	192	3	Triosephosphate isomerase
16	Tb09.160.1160	Q38FS0_9TRYP	85914	33	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
16	Tb10.100.0120	Q38CL5_9TRYP	27177	42	1	Proteasome subunit alpha type
16	Tb10.100.0170	Q38CK9_9TRYP	25355	104	2	Proteasome subunit alpha type
17	Tb10.70.7730	Q38CI6_9TRYP	49226	52	1	ATP-dependent DEAD/H RNA helicase, putative
18	Tb09.160.3270	IF4A_TRYBB	45362	79	3	Probable eukaryotic initiation factor 4A
18	Tb927.2.1560	Q585R7_9TRYP	29592	57	3	Cyclophilin type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative
18	Tb11.01.1190	Q383Y7_9TRYP	24788	29	1	ATP synthase, putative
18	Tb11.03.0410	Q387H6_9TRYP	17820	169	4	Eukaryotic translation initiation factor 5a, putative
19	Tb10.70.0530	Q38AX6_9TRYP	50038	30	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
19	Tb11.01.7800	Q381H3_9TRYP	16857	191	8	Nucleoside diphosphate kinase
19	Tb927.5.1000	Q57W45_9TRYP	16766	44	1	Ubiquitin carrier protein
19	Tb10.6k15.2050	Q38AC1_9TRYP	16061	48	1	40S ribosomal protein S12, putative
20	Tb927.4.2740	Q583A1_9TRYP	16328	37	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
20	Tb10.26.0680	Q389K9_9TRYP	14328	46	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
20	Tb927.7.4060	Q57UN6_9TRYP	12874	37	3	Calpain-like cysteine peptidase, putative
20	Tb09.211.4511	Q38D58_9TRYP	11077	61	1	Kinetoplastid membrane protein KMP-11
21	Tb927.4.3950	Q57XZ9_9TRYP	94654	38	1	Cytoskeleton-associated protein CAP5.5, putative
21	Tb11.01.6230	Q381X5_9TRYP	55541	32	21	Expression site-associated gene 2 (ESAG2) protein, putative
22	Tb927.3.3580	Q57W94_9TRYP	87767	58	3	Lipophosphoglycan biosynthetic protein, putative
22	Tb10.70.1190	Q38B27_9TRYP	85826	144	5	Valosin-containing protein homolog
22	Tb11.01.3110	Q383E5_9TRYP	75367	248	5	Heat shock protein 70
22	Tb11.01.3080	Q383E9_9TRYP	73631	92	3	Heat shock protein 70, putative
22	Tb11.01.2530	Q383K3_9TRYP	69885	29	3	Kinesin-like protein, putative
22	Tb11.02.5210	Q384T4_9TRYP	33522	32	1	RNA binding protein, putative
23	Tb10.26.1080	Q389P1_9TRYP	80763	555	16	Heat shock protein 83
23	Tb927.8.4970	Q57UH2_9TRYP	69597	156	4	69 kDa paraflagellar rod protein
23	Tb927.3.4290	Q580L2_9TRYP	68683	281	8	73 kDa paraflagellar rod protein
23	Tb927.4.1080	Q580D6_9TRYP	67750	151	4	V-type ATPase, A subunit, putative
23	Tb11.02.1120	Q386E7_9TRYP	66675	87	1	Adenylosuccinate synthetase, putative
23	Tb10.6k15.2620	Q38AH1_9TRYP	60604	230	5	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
23	Tb11.02.0070	Q386R3_9TRYP	60586	104	2	Aminopeptidase, putative
23	Tb11.01.6010	Q381Z6_9TRYP	59582	40	3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
24	Tb927.4.2560	Q584D1_9TRYP	73791	30	1	Cardiolipin synthetase, putative
24	Tb11.03.0340	Q387H1_9TRYP	60803	46	1	Protein kinase, putative
24	Tb09.211.0920	Q38E64_9TRYP	60538	42	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
24	Tb09.211.3540	Q38DF3_9TRYP	56336	381	10	Glycerol kinase, glycosomal
24	Tb11.02.4440	Q385B0_9TRYP	55359	72	2	Aminopeptidase, putative
24	Tb09.244.2710	Q38CY5_9TRYP	46622	29	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
25	Tb10.406.0520	Q389T8_9TRYP	53157	53	1	Trypanothione reductase
25	Tb11.01.1350	Q383X0_9TRYP	48448	205	7	Adenosylhomocysteinase
25	Tb10.389.0340	Q388T5_9TRYP	37360	29	1	Mitochondrial carrier protein, putative
26	Tb10.70.5800	Q38C41_9TRYP	51149	106	1	Hexokinase
26	Tb10.70.4740	Q38BV6_9TRYP	46592	267	7	Enolase

27	Tb927.1.700	Q4GZG4_9TRYP	47246	96	4	Phosphoglycerate kinase
27	Tb927.6.4840	Q586G3_9TRYP	43540	40	1	S-adenosylmethionine synthetase, putative
27	Tb11.01.6090	Q381Y8_9TRYP	21229	30	1	RNA polymerase-like protein
28	Tb10.6k15.3250	Q38AM2_9TRYP	54807	64	1	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain, putative
28	Tb927.6.4280	Q586Z5_9TRYP	43869	216	7	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal
29	Tb10.70.1370	Q38B42_9TRYP	41071	280	6	Fructose-bisphosphate aldolase, glycosomal, putative
29	Tb11.02.5400	Q384R5_9TRYP	39464	51	2	cystathionine beta-synthase, putative
29	Tb10.6k15.3850	Q38AR9_9TRYP	35611	181	4	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, cytosolic
30	Tb11.01.4020	Q382W2_9TRYP	61202	32	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
30	Tb927.3.4560	Q580I6_9TRYP	38202	45	1	Serine/threonine protein kinase, putative [Fragment]
30	Tb927.3.4560	Q582S9_9TRYP	32370	45	1	Serine/threonine protein kinase, putative [Fragment]
30	Tb927.7.5900	Q582K5_9TRYP	13253	29	2	Microtubule-associated protein 1A/1B, light chain 3, putative
31	Tb11.01.3170	Q383E1_9TRYP	34690	177	6	Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein
32	Tb11.02.0570	Q386K4_9TRYP	64325	41	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
32	Tb927.3.2230	Q582T6_9TRYP	31465	75	3	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit, putative
33	Tb09.211.0320	Q38EC7_9TRYP	64393	30	3	<i>Putative uncharacterized protein</i>
33	Tb09.160.3820	Q38F23_9TRYP	55005	125	3	Nucleolar RNA binding protein, putative
33	Tb11.01.5680	Q382C8_9TRYP	51674	31	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
33	Tb927.1.2330	Q4GYV6_9TRYP	49704	65	2	Beta tubulin
33	Tb927.4.3000	Q583X7_9TRYP	48574	35	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
33	Tb11.02.0490	Q86MV9_9TRYP	46390	30	2	RNA editing complex protein MP46
33	Tb11.01.1290	Q68CM1_9TRYP	30310	101	4	14-3-3 protein I
33	Tb11.02.4700	Q68CL8_9TRYP	29196	213	6	14-3-3 protein II
34	Tb10.6k15.3080	Q38AK7_9TRYP	48107	64	4	Dihydroliipoamide acetyltransferase, putative
34	Tb10.70.3290	Q38BK1_9TRYP	46468	35	1	ATP-dependent DEAD-box RNA helicase, putative
34	Tb11.01.4660	Q382M7_9TRYP	46304	67	1	Elongation factor 1 gamma, putative
34	Tb10.6k15.1160	Q38A49_9TRYP	29333	40	1	G-actin binding protein, putative
34	Tb927.5.1160	Q57VE7_9TRYP	25570	45	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
34	Tb927.8.3790	Q580Z9_9TRYP	25120	63	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>
34	Tb09.211.0110	Q967R7_9TRYP	24736	36	1	QM-like protein
34	Tb927.7.4520	Q57X68_9TRYP	22315	60	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
35	Tb09.211.2590	Q38DP7_9TRYP	27403	62	3	Proteasome subunit beta type
35	Tb927.3.780	Q9NDA3_9TRYP	25463	43	1	20S proteasome alpha 7 subunit
36	Tb927.1.2340	Q4GYV5_9TRYP	49787	69	2	Alpha tubulin
36	Tb10.70.4420	Q38BT8_9TRYP	44445	36	20	<i>Putative uncharacterized protein</i>
36	Tb927.8.1990	Q9GU47_9TRYP	25632	201	5	Tryparedoxin peroxidase
36	Tb927.7.570	Q57TZ7_9TRYP	22754	46	2	Prefoldin, putative
36	Tb927.7.7460	Q57TY3_9TRYP	22358	49	2	<i>Putative uncharacterized protein</i>
37	Tb09.211.0740	Q38E83_9TRYP	21060	42	1	p21 antigen protein, putative
37	Tb11.03.0250	Q387G2_9TRYP	18717	38	1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
38	Tb927.5.1700	Q57ZN9_9TRYP	27593	34	1	Replication Factor A 28 kDa subunit, putative
38	Tb11.50.0005	Q4FKD4_9TRYP	18002	42	1	60S ribosomal protein L21E, putative
39	Tb10.61.3210	Q388M8_9TRYP	37612	38	1	<i>Putative uncharacterized protein</i>

39	Tb927.3.4000	Q57WD6_9TRYP	18409	47	1	Clathrin coat assembly protein AP19, putative
39	Tb11.02.0815	Q386I0_9TRYP	15654	41	1	Ubiquitin-conjugating enzyme, putative
39	Tb927.7.4480	Q57X64_9TRYP	15550	33	1	Adenosine 5'-monophosphoramidase, putative
39	Tb927.3.5180	Q580V7_9TRYP	15119	59	1	Cofilin/actin depolymerizing factor, putative
40	Tb09.211.0560	Q38EA2_9TRYP	36985	36	1	RNA-binding protein, putative
40	Tb927.4.1860	Q583K7_9TRYP	18846	45	1	Ribosomal protein S19, putative
40	Tb10.70.7020	Q38CD1_9TRYP	15929	66	1	40S ribosomal protein S23, putative
40	Tb10.6k15.3340	Q38AM9_9TRYP	15684	38	1	40S ribosomal protein S24E, putative
40	Tb10.70.2520	Q38BD2_9TRYP	13029	34	1	Dynein light chain, putative

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

**ETUDE PROTEOMIQUE DES FACTEURS EXCRETES/SECRETES AU COURS
DES INFECTIONS A *TRYPANOSOMA CONGOLENSE***

Grébaut Pascal

RESUME

La trypanosomose à *Trypanosoma congolense* est une parasitose animale qui constitue toujours un véritable frein au développement de l'élevage bovin en Afrique subsaharienne. L'infection se traduit chez l'animal infecté par une anémie, une hypocomplémentémie et des processus auto-inflammatoires dégénératifs. Les protéines excrétées/sécrétées (PES) par le trypanosome dans le sang de l'hôte constituent les premiers éléments du dialogue s'instaurant entre le parasite et son hôte.

Nous avons standardisé une méthode de production des PES à partir de culture de trypanosomes *in vivo*. La comparaison des profils bidimensionnels des protéomes et sécrétomes nous a permis de démontrer la qualité des sécrétomes analysés, exempts de toute pollution en provenance du protéome.

Les premiers résultats de spectrométrie de masse nous ont permis de réaliser un catalogue exhaustif de 181 protéines identifiées. Parmi elles, 28 sont décrites dans la littérature en tant que candidats potentiels pour leurs propriétés diagnostic, chimiothérapeutiques ou vaccinales dans des modèles parasitaires proches de *T. congolense*. Seule, la cyclophyline de type A est une des protéines identifiées qui est caractérisée chez *T. congolense* comme marqueur de virulence et de pathogénicité.

La mise en œuvre d'une approche comparative du différentiel d'expression des sécrétomes et des protéomes de deux clones de *T. congolense*, nous a permis de mettre en évidence une stratégie moléculaire corrélée à l'infectiosité du parasite. Nous avons également caractérisé de nombreuses protéines ayant une même identification mais s'exprimant comme des isoformes à des degrés de phosphorylation différents ou comme des formes de poids moléculaires différents présentant une étape de maturation (glycosylation, protéolyse). Ces molécules représentent donc de nouveaux marqueurs de virulence et de pathogénicité de *T. congolense* ouvrant de nouvelles voies pour améliorer le diagnostic de terrain de la trypanosomose animale et proposer de nouvelles stratégies d'interférence avec le processus infectieux.

Mots-Clés : Trypanosomes, sécrétome, protéines, différentiel d'expression, spectrométrie de masse