

Thèse en cotutelle

Pour obtenir le grade de
**Docteur des Universités Bordeaux 1, Bordeaux 2
et Bangui**

**Présentée et soutenue publiquement
à l'Université Bordeaux 2 le 30 octobre 2013**

Par Romaric NZOUMBOU-BOKO

**Mention : Sciences Technologie Santé
Spécialité : Microbiologie - Immunologie**

**Caractérisation d'une voie Immunomodulatrice
impliquant l'arginase dans les Trypanosomoses**

Membres du Jury:

Dr Frédéric BRINGAUD, Université Bordeaux Segalen

Dr Alain GOBERT, INRA, Clermont Ferrand

Pr Jean-Louis MEGE, CNRS / Université Aix Marseille

Dr Bernard BOUTEILLE, Université de Limoges

Pr Philippe VINCENDEAU, Université Bordeaux Segalen

Président

Rapporteur

Rapporteur

Invité

Directeur de Thèse

« La recherche est un des métiers les plus difficiles, parce qu'on a en face de soi 90% d'échec et 10% de succès...mais à côté de ça, vous ne pouvez faire ce travail que si vous êtes passionnés, si vous avez envie d'agréger la connaissance »

Julien LABOUREAU

A la République Centrafricaine.

Remerciements

Je remercie le Professeur Jean-Louis MEGE et le Docteur Alain GOBERT qui ont accepté de juger ce travail et de siéger comme rapporteur. Leurs remarques et suggestions ont contribué à l'amélioration de la qualité de ce manuscrit. Je leur en suis très reconnaissant.

Je remercie également le Docteur Frédéric BRINGAUD qui m'a fait l'honneur de présider ce jury.

Je remercie le Docteur Bernard BOUTEILLE qui n'a ménagé aucun effort pour répondre à l'invitation d'être examinateur dans ce jury.

Je remercie le Professeur Philippe VINCENDEAU, mon Directeur de thèse et en même temps Directeur de mon Laboratoire d'accueil de m'avoir offert l'opportunité de faire cette thèse. J'ai appris beaucoup de choses auprès de lui depuis mes années de Master et de thèse, nos missions de prospection dans les foyers de la THA et les divers congrès. Je le remercie pour m'avoir guidé, encouragé, éclairé et conseillé tout au long de ces années de thèses à la fois difficiles et riches en rebondissements, aboutissant à ma maturité tant sur le plan personnel que professionnel. Je garderai à jamais son mot d'or « On va y arriver ». Je loue sa patience.

Je témoigne également ma gratitude envers le Docteur Silla SEMBALLA, mon co-directeur, pour sa contribution à ma formation depuis mes années de master et pendant mes travaux de thèse. Il n'a pas été seulement mon co-directeur mais un conseiller scientifique et un mentor. J'oublierai à jamais nos moments de manip de chromatographie d'affinité et de la réalisation de 30 plaques d'ELISA par jours.

Mes remerciements à Monsieur Jean-Philippe DESCHAMPS, attaché de coopération éducative dans le Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France à Bangui, de n'avoir ménagé aucun effort pour m'octroyer un financement permettant la réalisation de ce projet. J'en profite également pour remercier tous les membres du SCAC à savoir Monsieur Didier NIEWIADOWSKI, Mme LEJEUNE, Monsieur Jean-Claude RICHARD et Mme Nadia ISAAC pour leurs soutiens multiformes.

Mes remerciements aux Professeurs Gustave BOBOSSI SERENBGE, Recteur de l'Université de Bangui, qui m'a beaucoup aidé pour me permettre d'effectuer cette thèse.

Mes remerciements au Professeur Roger MARTHAN et à Mme Catherine CEYRAC respectivement Directeur et Secrétaire de notre Ecole Doctorale.

Mes remerciements au Docteur Sylvie DAULOUEDE pour sa participation à ma formation tant sur le plan technique que sur le plan organisationnel.

Mes remerciements vont à l'endroit de Mme Pierrette COURTOIS, ingénieur de recherche, manager de notre labo, auprès de laquelle j'ai appris beaucoup de techniques. Je n'oublierai jamais le surnom («le puriste de l'équipe») qu'elle m'a attribué et aussi nos moments des manipulations.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de Mme Patricia NABOS, adjointe technique de notre laboratoire pour sa collaboration et son soutien pendant mes années de thèse.

A celle que j'appelle affectueusement Mamy DETHOUA, tu as été pour moi une collègue exemplaire, franche et une complice, je n'oublierai jamais nos moments de partage et de discussion, nos missions de prospections et nos voyages pour diverses conférences, colloques et congrès.

Mes remerciements aux Docteurs Maria MAMANI MATSUDA, Tina KAUSS, Jérôme RAMBERT, à Vincent PITARD et Santiago GONZALES pour leurs précieuses contributions dans la réalisation de mes travaux.

Au Professeur ALIOUM Ahmadou de l'ISPED pour son appui en analyse statistique et au Professeur André QUINTON pour son encouragement et ses cours de pédagogie.

Au Docteur Stéphanie MATRAT et à Anaëlle DUBOIS pour leur collaboration durant mon stage au Laboratoire de Microbiologie de l'INRA Clermont Ferrand. J'ai appris en votre compagnie beaucoup de pratiques en biologie moléculaire en un temps malheureusement trop limité.

A Monsieur Paul NGAISSONA, vous avez été l'un de tout premier à souligner que j'avais une bonne base scientifique et des potentialités pour des études universitaires avancées. Vous m'avez marqué dans vos styles d'enseignements dirigés et travaux pratiques. J'ai appris beaucoup des fondamentaux de biochimie et chimie organique auprès de vous. Je vous remercie infiniment.

Aux Docteurs Innocent NZINGA, Ephrem KOSH-KOMBA et Monsieur Didier LAKOUE TENE pour m'avoir enseigné et encadré durant mes débuts dans la recherche à l'Université de Bangui.

Au Docteur Narcisse KOMAS, les acquis de vos cours de pharmacologie et de métabolisme cellulaire m'ont beaucoup servi pour la compréhension des mécanismes de signalisation intracellulaire. Vos approches pédagogiques par analyse des articles m'ont été très utiles pour mes recherches bibliographiques.

Au Docteur Rémi LAGANIER, pour avoir guidé mes pas lors de mon initiation à la recherche à l'Institut Pasteur de Bangui. Tu as été pour moi un maître et un ami. Tu ne ménageais aucun effort pour m'apprendre les choses des plus simples aux plus compliquées. Je n'oublierai jamais nos moments de manip paludisme OMS et aussi nos derbys de foot sur la pelouse de l'Institut Pasteur de Bangui.

A mon Père Eloi NZOUMBOU, Papa, je pense qu'il y a beaucoup de coïncidence sur nos chemins. Tu as été l'un des pionniers de l'équipe Trypanosomose Humaine Africaine de la RCA, j'étais encore enfant quand tu parlais d'un colorant, de la mobilité des trypanosomes, du foyer de Bilolo. Après tes études de médecine, tu as voulu te spécialiser en Parasitologie ou en Immuno-hématologie. Tu n'as pas pu concrétiser ce projet en restant un médecin généraliste chevronné. Tu aurais désiré que je fasse médecine pour me spécialiser dans ces domaines. J'ai fini par faire la science et je t'offre un Doctorat en sciences spécialité Immuno-microbiologie, fait dans un laboratoire de parasitologie, avec comme sujet les trypanosomes.

A ma mère Rébecca NZOUMBOU née NGBOWALI, alias « mama ti djo », pour m'avoir élevé, éduqué, et permis mon évolution ultérieure.

A ma fiancée, Nicole GADO, Je te remercie pour ton soutien, ta patience et ton amour.

A ma puce Chloé, qui m'a tant manqué pendant ces séjours de thèse.

A mes frères et sœurs : Prisca, Christian, Grâce, Reine, Loïc, Micheline, Clotilde, Ester, Merveille et Suzy.

A Madame BALLET Gertrude, ma tante tant aimée, à ma belle sœur Ya adé, à Pierrot et Romuald sans oublier Gervais.

Au Couple KONGOUBE pour avoir m'accueilli lors de mon arrivé en France et de mes voyages à Paris.

A Monsieur Céphas MABADA pour ses multiples relectures

Aux couples GABATO et PEREZ pour vos conseils et soutiens.

A mes tontons et amis, Docteur Ferdinand NADJI-ADJIM, Monsieur Arsène Bruno MINIME, Monsieur Djibrine DJALLE pour vos conseils et soutiens.

A mes amis d'enfance, du lycée et de la Fac : Freddy NIAMATHE, Angèle DOBARAT, Jean Igor CAMEROUN, Marina OLE SANGBA, François NDONG BIDZAND, Fabrice MOBETTY, Gina-Laure LAGOHE GUEMBE, Eric BANINGA, Hermann ELOKOUA pour vos amitiés sincères et soutiens tout au long de mon cursus.

Ce manuscrit est constitué de deux articles publiés et d'un 3^{ème} article soumis pour publication, je tiens à remercier tous les co-auteurs de ces différents articles, l'équipe de Brazzaville, de Lyon, de Limoges et de Bruxelles.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont encouragé dans cette voie, à savoir mes jeunes collaborateurs du LASBAD, ceux de l'Institut Pasteur de Bangui sans oublier les étudiants centrafricains de Bordeaux.

Publications

Article N°1

Romarc Nzoumbou-Boko, Géraldine De Muyler, Stéphanie Matrat, Mariette Dethoua, Philippe Holzmuller, Sylvie Daulouède, Laurence Lecordier, Silla Semballa, Vincent Pitard, Pierrette Courtois, Pierrick Uzureau, Alain Beschin, Etienne Pays et Philippe Vincendeau.

***Trypanosoma musculi* releases factors that promote parasite growth through mannose receptor-mediated arginase activation**

En préparation

Article N°2

Nzoumbou-Boko R, Dethoua M, Gabriel F, Buguet A, Cespuglio R, Courtois P, Daulouède S, Bouteille B, Ngampo S, Mpandzou G, Semballa S, Vincendeau P. Serum Arginase, a Biomarker of Treatment Efficacy in Human African Trypanosomiasis

J Clin Microbiol. 2013 ; 51(7):2379-81.doi: 10.1128/JCM.03371-12.

Article N°3

Dethoua M, Nzoumbou-Boko R, Truc P, Daulouède S, Courtois P, Bucheton B, Cuny G, Semballa S, Vincendeau P.

Evaluation of Trypanocidal Drugs used for HAT against *T. lewisi*

Accepté pour publication dans Parasite

Communications scientifiques

1. **Poster:** Romarc Nzoumbou-Boko, Géraldine De Muyler, Mariette Dethoua, Philippe Holzmuller, Sylvie Daulouède, Laurence Lecordier, Pierrette Courtois, Pierrick Uzureau, Alain Beschin, Etienne Pays et Philippe Vincendeau.

Induction of macrophage arginase by a *Trypanosoma musculi* factor favour infection.

**European Macrophage and Dendritic Society Meeting, Edinburg, Scotland,. 2010,*

**Réunion thématique « Trypanosomes » Paris, 2011.*

**Journée de l'école Doctorale des Sciences de la vie et de la Santé de Bordeaux, Arcachon 10 avril 2013.*

**Congrès Conjoint Société Française de Parasitologie /Sociedad Española de Parasitologia, Dijon 2013.*

2. **Communication orale:** Nzoumbou-Boko R, Dethoua M, Gabriel F, Buguet A, Cespuglio R, Courtois P, Daulouède S, Bouteille B, Ngampo S, Mpandzou G, Semballa S, Vincendeau P. Serum Arginase, a Biomarker of Treatment Efficacy in Human African Trypanosomiasis.

**R&D for Neglected Diseases in Africa. Endemic Country Research and Development for Patient Access, Nairobi (Kenya) June 2013.*

**sous forme de poster lors du Congrès Conjoint Société Française de Parasitologie /Sociedad Espanola de Parasitologia, Dijon du 16 au 17 mai 2013.*

Sigles et Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ApoL-1 : Apolipoprotéine A-1
ARNm : Acide Ribonucléique Messenger
ATM : Macrophages Tissulaires Adipose
CATT: Card Agglutination Test for human Trypanosomiasis
C/EBP β : Ccaat-enhancer-binding proteins
CD : Cluster of Différenciation
CDC : Center for Diseases Control
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène
CR: complement receptor
CREB : C-AMP Response Element-binding protein
CSF: Colony-Stimulating Factor
CTC : Centrifugation en Tube Capillaire
CXCL4 : CXC chemokine Ligand 4
Cz : Cruzipaine
DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DEAE cellulose: diéthylaminoéthyl cellulose
DFMO : DiFluoroMéthyl Ornithine
EHEC: *Escherichia coli* entérohémorragique
ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay
ES : Site d'expression
ESF : Excreted secreted factors
Fc: Région Fc des immunoglobulines
FcR: Récepteur pour la région Fc des immunoglobulines
Foxp3: Forkhead box P3
GATA3: GATA binding protein 3
G-CSF: Granulocyte-Colony-Stimulating Factor
HO-1: Hème Oxygénase 1
HPR: Haptoglobin-related protein
IL-1: Interleukine-1
IDO: Indoleamine 2, 3-dioxygenase
IFN- γ : Interféron- γ
iNOS: Nitric oxide synthase inductible
IRF4 : Interferon regulatory factor 4
ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
KO : Knockout
LAMP : Loop-mediated isothermal amplification
LCR : liquide céphalo-rachidien
LDL : Low Density Lipoprotein
LPS : Lipopolysaccharide
LXA4 : lipoxin A4
M : Macrophage
MAPK-p38: p38 mitogen-activated protein kinases
MBP: Mannose Binding Protein
MMR : Macrophage mannose receptor
Mn : Manganèse
Mrc1 : Mannose receptor C type 1

NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
 NECT : Combinaison Thérapeutique de Nifurtimox et Eflornithine
 NK : Natural Killer
 NFkB : nuclear factor-kappa B
 NO : monoxyde d'azote
 nTregs : lymphocytes T régulateurs naturels
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 Ox-PL-PPC : ox-PL 1-palmitoyl-2arachidonoyl*sn*-glycero-3-phosphorylcholine
 ODC : Ornithine décarboxylase
 OAT : Ornithine aminotransferase
 PNLTHA : Programme National de la Lutte contre la THA
 PAMPs : Pathogen-associated molecular pattern
 pg: picogramme
 PDE2: Phosphodiesterase E2
 PM : Poids moléculaire
 PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ
 PKA: Protéine kinase A
 PGJ2 : Prostaglandine J2
 PRR: Pattern-Recognition Receptors
 RDC : République Démocratique du Congo
 PCR : Polymerase chain reaction
 ROR γ t : RAR-related orphan receptor gamma
 Srxn-1 : Sulfiredoxin-1
 SRA : Serum resistance-associated
 STAT : Signal Transduction and Activator Transcription
 TbKHC1 : *Trypanosoma brucei* Kinesin Heavy Chain
 THA : Trypanosomose Humaine Africaine
 THat : Trypanosomose humaine atypique
 TLF: Trypanosome Lytic Factor
 TLTF : Trypanosome-derived Lymphocyte-Triggering Facteur
 TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
 TGF- β : Transforming Growth Factor-beta
 TLR: Toll-Like Receptor
 TAMs : Tumor Associated Macrophages
 tXNRD-1 : thiorédoxine-1 réductase
 VAT : Variant antigen Type
 VIH : Virus de l'immunodéficience humaine
 VSG : Glycoprotéine Variable de Surface

Table des matières

Introduction	2
I. Revue Bibliographique	
1.1 La THA	7
1.1.1 Répartition géographique	7
1.1.2 Agent pathogène	9
1.1.2.1 Systématique	9
1.1.2.2 Architecture et particularités biologiques et métaboliques des trypanosomes	12
1.1.2.3 Cycle de développement du parasite	20
1.1.3 Agent vecteur	20
1.1.4 Symptomatologie et Tableau Clinique de la THA	22
1.1.4.1 La phase Lymphatico-sanguine	22
1.1.4.2 La phase méningo-encéphalitique	23
1.1.4.3 Formes cliniques	24
1.1.4.4 Trypanosomoses Atypiques	24
1.1.5 Diagnostic et Prise en charge thérapeutique	27
1.1.5.1 Diagnostic	27
1.1.5.2 Prise en charge thérapeutique	30
1.2 Immunopathologie de la THA	34
1.2.1 Rappels Immunologiques	34
1.2.1.1 Hiérarchie hématopoïétique	34
1.2.1.2 La polarisation ou les états d'activation des Lymphocytes T	37
1.2.1.3 La polarisation ou les états d'activations des macrophages	43
1.2.1.4 Les grandes groupes de récepteurs de l'immunité	51
1.2.2 Immunopathologie et relation hôte/parasite dans la THA	57
1.2.2.1 Réponse de l'organisme	57
1.2.2.2 Mécanismes d'échappements élaborés par le trypanosome	57
1.3 L'arginase	68
1.3.1 Localisation, structure et propriétés physico-chimiques	68
1.3.2 Fonction des arginases	69

1.3.3 Voie de signalisation	71
1.3.4 Pathologies liées à l'arginase	76
II Travaux de recherche	
2.1 Les objectifs de l'étude	83
2.2 Résultats	
2.2.1 Article 1: <i>Trypanosoma musculi</i> excreted/secreted factors bind mannose receptors inducing arginase and parasite growth	
2.2.2 Article 2: Arginase serum, a biomarker of efficacy treatment in human African trypanosomiasis	
2.2.3 Article 3: Evaluation of Trypanocidal Drugs used for HAT against <i>T. lewisi</i>	
2.3 Discussion	129
Conclusion et perspectives	136
Bibliographie	137

INTRODUCTION

Introduction

La Trypanosomose Humaine Africaine (THA) ou Maladie du Sommeil, parasitose à transmission vectorielle, demeure un problème majeur de santé publique dans les régions de l'Afrique sub-saharienne (Simarro *et al.*, 2012). Elle a décimé les populations durant le siècle dernier en Afrique noire. La première approche descriptive de la trypanosomose dans le contexte de la maladie du sommeil fut réalisée vers le XIV^{ème} siècle mais le diagnostic formel est fait dans les années 1840 par Clarke. La THA a été à l'origine de 3 épisodes d'épidémie avec des grandes vagues épidémiques dont la plus redoutable reste celle des années 1920. Après les remarquables travaux de Jamot, la maladie semblait être neutralisée, ainsi, la trypanosomose était devenue au fil des années une maladie négligée et oubliée.

Cependant, les instabilités, les abandons des programmes de lutte contre les grandes endémies, les troubles militaro-politiques et autres mouvements de population ont particulièrement désorganisé le système sanitaire, engendrant une réémergence de cette maladie. Elle présente un taux de prévalence non négligeable avec 70 millions de personnes exposées, affectant annuellement à la fin du XX^{ème} siècle 350 000 à 500 000 malades avec 150 000 morts (Brun *et al.*, 2010 ; Kennedy *et al.*, 2013). Les efforts entrepris depuis, ont entraîné une diminution du nombre de malades, estimé à 10-20 000 cas rapportés par an (Simarro *et al.*, 2011). Ces chiffres ne représentent que la partie émergée de l'iceberg car seules environ 10% des personnes exposées bénéficient d'une surveillance active dans les foyers, par manque de moyens des services sanitaires des pays concernés (Malvy et Chappuis, 2011). En outre, la THA pose de nombreux problèmes au niveau du diagnostic et du traitement car le diagnostic présente encore des difficultés et les molécules disponibles (dont un dérivé de l'arsenic) sont toxiques, anciennes et parfois inefficaces. Les parasites du genre *Trypanosoma* affectent initialement le bétail et d'autres espèces animales ; l'espèce humaine et certains primates présentent une résistance naturelle aux trypanosomes. Cette résistance est due à la présence d'un facteur lytique (Hager *et al.*, 1994), le TLF (Trypanosome Lytic Factor)-1, retrouvé dans le sérum et contenant l'apolipoprotéine A-1 (APoL-1), et l'haptoglobine-related protéine (HPR). L'ApoL-1, une fois absorbée à l'intérieur du parasite, forme des pores dans la membrane des organites (vacuoles, lysosomes) parasites, provoquant ainsi la lyse du trypanosome chez l'homme (Vanhamme *et al.*, 2003 ; Uzureau *et al.*, 2013). Deux parasites du complexe *brucei* à savoir *Trypanosoma brucei gambiense* (*T. b. gambiense*) et *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*T. b. rhodesiense*) ont

réussi à élaborer un mécanisme d'échappement pour contourner l'ApoL-1 afin de franchir la barrière d'espèce et infester l'homme.

L'infection de l'hôte par des trypanosomes, protozoaires extracellulaires, déclenche une réponse immunitaire importante de l'hôte. Le parasite se développe dans un premier temps au niveau du chancre d'inoculation puis dans la lymphe, le sang, et divers tissus tels que le myocarde avant de gagner le système nerveux central aboutissant à la cachexie sommeilleuse (d'où le nom de maladie du sommeil) et à la mort. Le système immunitaire est donc largement sollicité depuis la formation du chancre jusqu'à la cachexie sommeilleuse.

La co-évolution des parasites *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* avec leur hôte a permis aux parasites d'élaborer une série d'autres mécanismes d'échappement au système immunitaire. Le phénomène de la variation antigénique, par renouvellement de la glycoprotéine de surface parasitaire, constitue le mécanisme d'échappement majeur du parasite à la réponse immunitaire de l'hôte, lui permettant de contourner une réponse efficace des anticorps. Cette glycoprotéine variable de surface est également à l'origine de l'inhibition de la lyse induite par le complément. En plus, les trypanosomes ont développé un autre mécanisme par la sécrétion d'un facteur TLTF (Trypanosome-derived Lymphocyte-Triggering Factor), qui active la production d'interféron- γ (IFN- γ) par les Lymphocytes TCD8 ; l'IFN- γ , à son tour, stimule la croissance du parasite (Hamadien *et al.*, 1990). La fixation des régions Fc des anticorps, mise en évidence dans la trypanosomose à *Trypanosoma musculi* (Vincendeau et Daëron, 1989), complète la liste des multiples mécanismes d'échappement mis en jeu par les trypanosomes. Enfin, l'induction de la voie de l'arginase macrophagique, enzyme catalysant la biosynthèse des molécules nécessaires à la croissance des trypanosomes (Gobert *et al.*, 2000), constitue à la fois un mécanisme indispensable à la multiplication du parasite et un mécanisme inhibant la production de molécules microbicides. En effet, l'arginase partage avec la iNOS le même substrat, l'arginine. La iNOS catalyse l'arginine en citrulline et NO, un radical libre cytotoxique très efficace sur de nombreux agents pathogènes dont les trypanosomes (Vincendeau et Daulouède, 1991 ; Vincendeau *et al.*, 1992). Ainsi, l'induction de l'arginase par le parasite inhibe ou diminue la production de NO, ce qui permet aux parasites d'échapper à l'effet de NO et de bénéficier de l'ornithine, produit du catabolisme de l'arginine via la voie de l'arginase. Des travaux préliminaires sur l'implication de la voie arginase dans l'échappement du parasite ont été réalisés avec le modèle murin et les espèces *T. b. gambiense* et *T. b. brucei* (responsable de trypanosomoses animales). Gobert *et al.* en 2000 ont montré *in vivo* que les macrophages péritonéaux des souris infectées avec *T. b. brucei* présentent une activité arginase élevée. Ils ont aussi observé une prolifération de ce parasite dans le péritoine, très réduite par l'injection d'un

inhibiteur de l'arginase et d'arginine. Cependant, le modèle expérimental murin et la majorité des parasites du complexe *brucei* sont à l'origine d'une infection aiguë chez la souris, ce qui ne permet pas d'évaluer dans le temps les différentes étapes de la voie de l'arginase. En outre, la présence de la Glycoprotéine Variable de Surface (VSG) à l'origine du mécanisme d'échappement majeur interfère ou masque l'effet de la voie de l'arginase, d'où l'intérêt de nos travaux orientés sur la caractérisation, dans un modèle parasitaire évoluant chez son hôte naturel, d'une voie immunomodulatrice impliquant l'arginase dans les trypanosomoses.

I REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

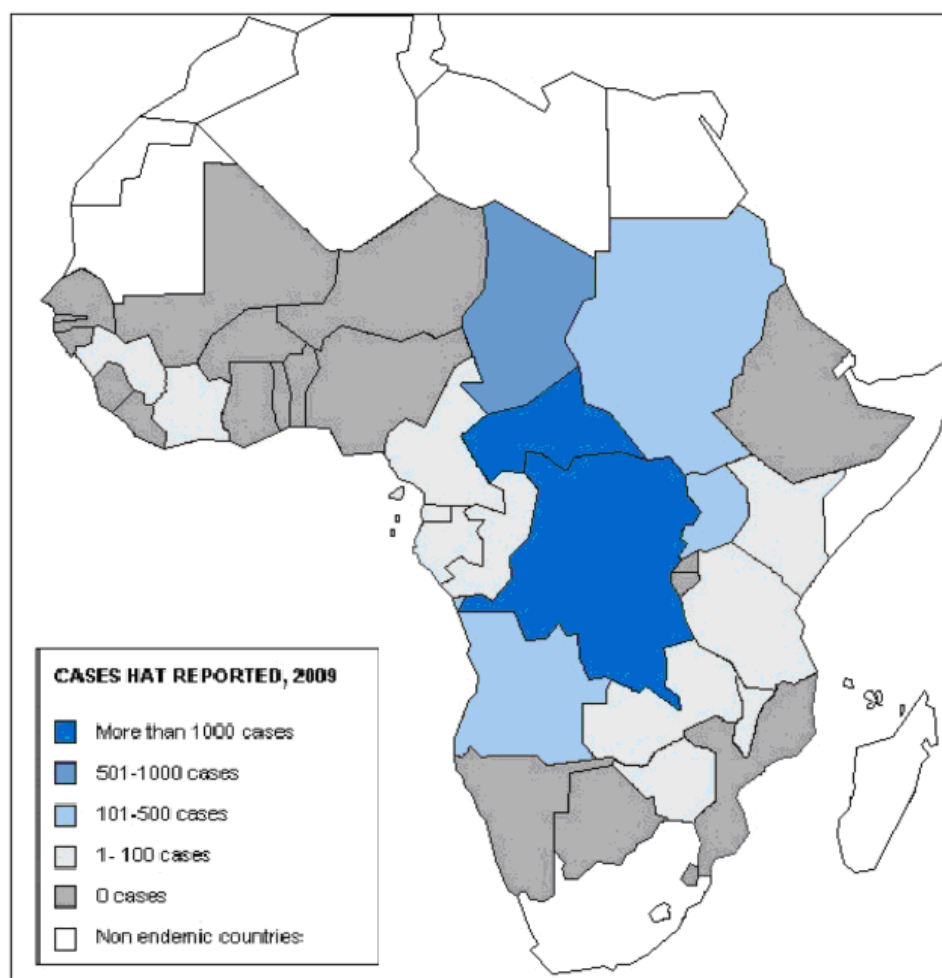


Figure N° 1 : Répartition géographique de la THA et statut épidémiologique des pays (Simarro *et al.*, 2011)

I. Revue Bibliographique

Nous verrons successivement :

- La THA, sa répartition géographique, son agent pathogène, ses vecteurs et sa symptomatologie clinique, son diagnostic et son traitement ;
- L'immunologie de la THA, après un rappel immunologique ;
- L'arginase : localisation, structure, fonctions et exemples de pathologie où elle est impliquée.

1.1 La Trypanosomose Humaine Africaine

La THA ou maladie du sommeil, provoquée par *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense*, transmis par la mouche tsé-tsé, est rivee en Afrique subsaharienne par les nécessités climatiques de ses vecteurs (Fig. 1). Sa symptomatologie est peu évocatrice au début, plus typique à la fin, avec des troubles du sommeil caractéristiques. Son diagnostic et son traitement sont déliquats.

1.1.1 Répartition géographique

La maladie du sommeil menace des millions de personnes dans 36 pays d'Afrique subsaharienne. Elle est rencontrée uniquement entre les 15^{ème} degrés de latitude Nord et Sud du continent africain, de la côte atlantique à l'océan indien, aire de distribution des glossines ou mouches tsé-tsé, uniques vecteurs des trypanosomes.

Environ 70 millions de personnes réparties sur une surface de 1,55 million de km² sont estimées « à risque » de contracter la THA (Simarro *et al.*, 2012).

La République Démocratique du Congo et la République Centrafricaine sont les pays où la trypanosomose épidémique présentent une forte prévalence et un niveau de transmission élevée, ces pays ont déclaré plus de 1000 nouveaux cas par an et la RDC concentre 83% des cas signalés en 2012. Viennent ensuite, le Tchad suivi de l'Angola, le Soudan, l'Ouganda, qui notifient entre 100 à 1000 nouveaux cas par an (Simarro *et al.*, 2011 ; Hartl *et al.*, 2013).

Un 3^{ème} groupe de pays présente une prévalence moins élevée mais en augmentation constante. Il s'agit du groupe constitué du Cameroun, du Congo, de la Côte d'Ivoire, des deux Guinéas (Conakry et équatoriale), du Mozambique, de la Tanzanie, du Kenya et de la Zambie, présentant moins de 100 nouveaux cas par an. Quelques pays ont un statut épidémiologique inconnu à ce jour, ou n'ont pas présenté des nouveaux cas depuis une décennie. Il s'agit : du Burundi, du Botswana, de l'Ethiopie, du Liberia, de la Namibie, du Rwanda, du Sénégal, et de la Sierra-Leone (Simarro *et al.*, 2011). Par ailleurs, la situation n'a pas beaucoup changé de 2010 à

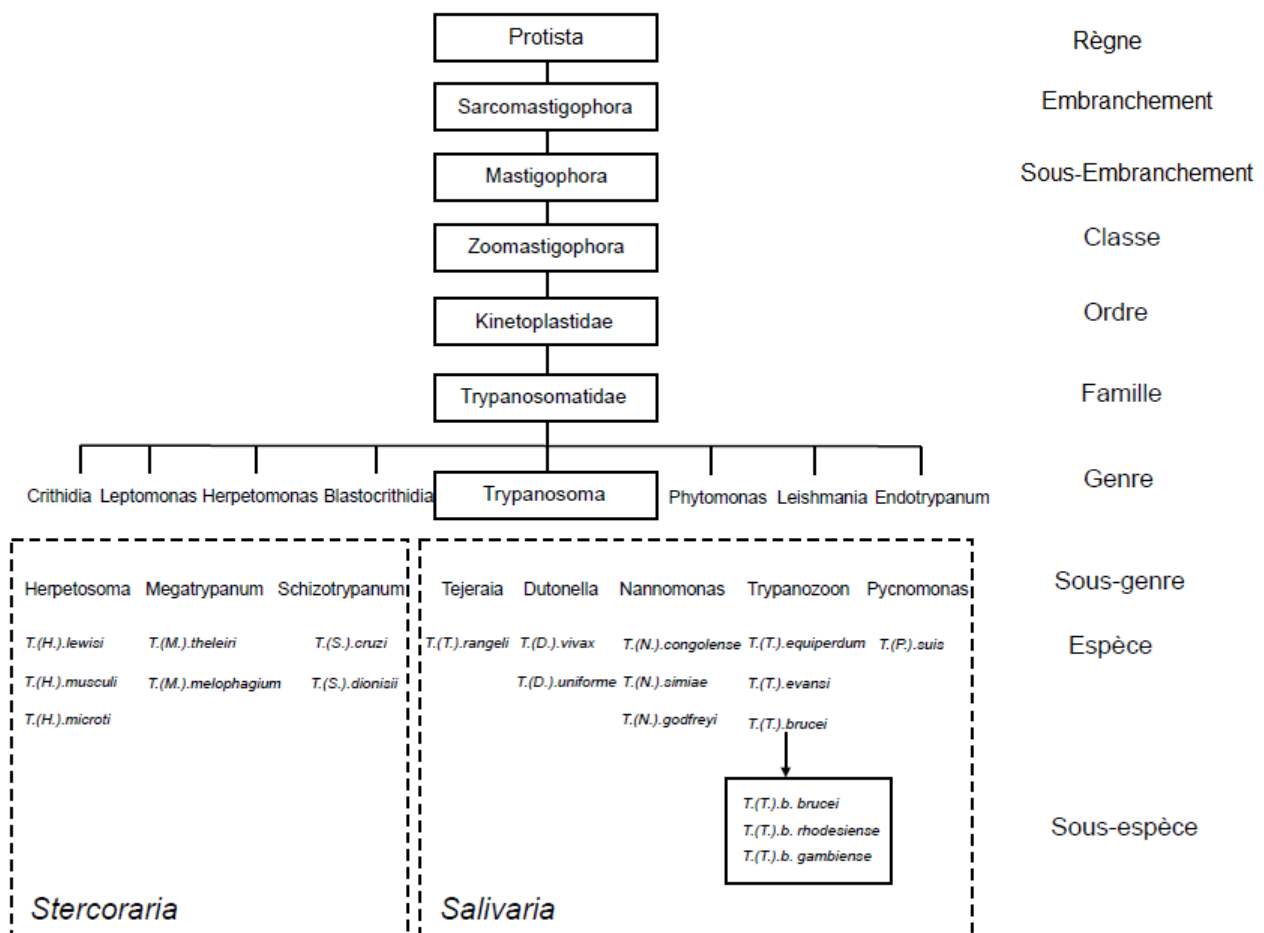


Figure N° 2 : Classification des trypanosomes (Vickermann *et al.*, 1985)

2013 avec quelques modifications épidémiologiques pour certains pays. Une grande partie des personnes touchées vivent dans des régions reculées surtout dans les zones rurales, et n'ont qu'un accès limité aux services de santé appropriés. Ceci fait obstacle à la surveillance, et par conséquent au diagnostic et au traitement des patients. Par ailleurs, pour la première fois en 1999, des foyers urbains et périurbains sont identifiés à Kinshasa (RDC) (Bilengue *et al.*, 2001). Des cas de THA d'importation ont été découverts sur des expatriés belges, allemands et français (Clerin *et al.*, 2012).

En outre, le déplacement des populations, la guerre et la pauvreté sont d'importants facteurs favorisant une transmission accrue de la maladie et modifiant sa répartition géographique du fait de systèmes de santé affaiblis, ou inexistants.

Dans cette zone, la maladie est caractérisée par des foyers endémiques avec de temps en temps une évolution sur le mode épidémique. Elle est rarement retrouvée de manière endémique au niveau de grandes étendues géographiques. Les foyers de la THA ne recouvrent pas l'ensemble de la zone sub-saharienne ; ils ont généralement des localisations très précises et souvent bien circonscrites, qui correspondent aux lieux de vie des vecteurs, les tsé-tsé, leurs limites dépendent de l'existence de conditions (biotiques et abiotiques) favorables au développement de ces vecteurs et à l'apparition ou au maintien de la maladie. En 1998, on comptait plus de 250 foyers actifs en Afrique subsaharienne, dans la «ceinture de la mouche tsé-tsé» (OMS, 1998).

1.1.2 Agent pathogène

1.1.2.1 Systématique

Très répandus dans la nature, les trypanosomes parasitent de nombreux vertébrés, poissons, amphibiens, reptiles, oiseaux, mammifères et même les plantes. Tous ne sont pas pathogènes. Il en existe deux grands groupes (Fig. 2) :

Les ***Stercoraria***, transmis par les déjections du vecteur. Le plus connu est *Trypanosoma cruzi*, agent de la trypanosomose américaine, dont le vecteur est une punaise appartenant à la famille des Reduviidae. *Trypanosoma cruzi*, chez l'hôte vertébré, comprend des formes extracellulaires et des formes intracellulaires. Un autre parasite, ***Trypanosoma musculi***, est un parasite naturel de la souris, à développement extracellulaire, dépourvu de VSG. Son cycle naturel comporte deux hôtes : un hôte intermédiaire, la puce, et un hôte définitif, la souris. La transmission s'effectue par ingestion des excréments de la puce ou de puce entière (Deane *et al.*, 1969 ; d'Alessandro *et al.*, 1970). Après contamination, la

parasitémie apparaît après 4 jours, la phase de prolifération exponentielle se développe entre J7 et J9 suivie d'un plateau entre J11 et J16 et enfin d'une phase d'élimination, la parasitémie durant environ 3 semaines (Derothe *et al.*, 1999). Le cycle se perpétue quand les puces se nourrissent d'un repas sanguin sur la souris parasitée. Le cycle de *T. musculi* et celui de *Trypanosoma lewisi* parasite naturel du rat sont superposables. Après élimination du trypanosome dans le sang, un faible nombre persiste et se multiplie dans les vasa recta des reins (Viens *et al.*, 1992) pendant le reste de la vie de la souris.

Les *Salivaria*, dont la transmission se fait par piqûre. L'exemple type est le complexe *brucei* qui comprend 3 espèces transmises par la mouche tsé-tsé.

Les parasites du complexe *brucei* sont des protozoaires extracellulaires (Fig. 3) chez l'hôte vertébré. Il existe trois espèces identiques d'un point de vue morphologique.

- *Trypanosoma brucei brucei*, parasite du bétail et des carnivores domestiques, responsable d'une trypanosomose animale appelée Nagana.

- *Trypanosoma brucei gambiense*, agent de la maladie du sommeil dans sa forme chronique en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale. Il n'est théoriquement pathogène que pour l'homme. Il est responsable de 95% de cas de THA (OMS, 2013).

- *Trypanosoma brucei rhodesiense* est l'agent d'une anthroponose. Présent en Afrique de l'Est, il est responsable chez l'homme d'une forme particulière de la THA dont l'évolution clinique est aiguë. Il est responsable de 5% de cas de THA (Hartl *et al.*, 2013). L'inquiétude révèle le fait que les zones se recoupent avec un risque d'apparition des formes hybrides.

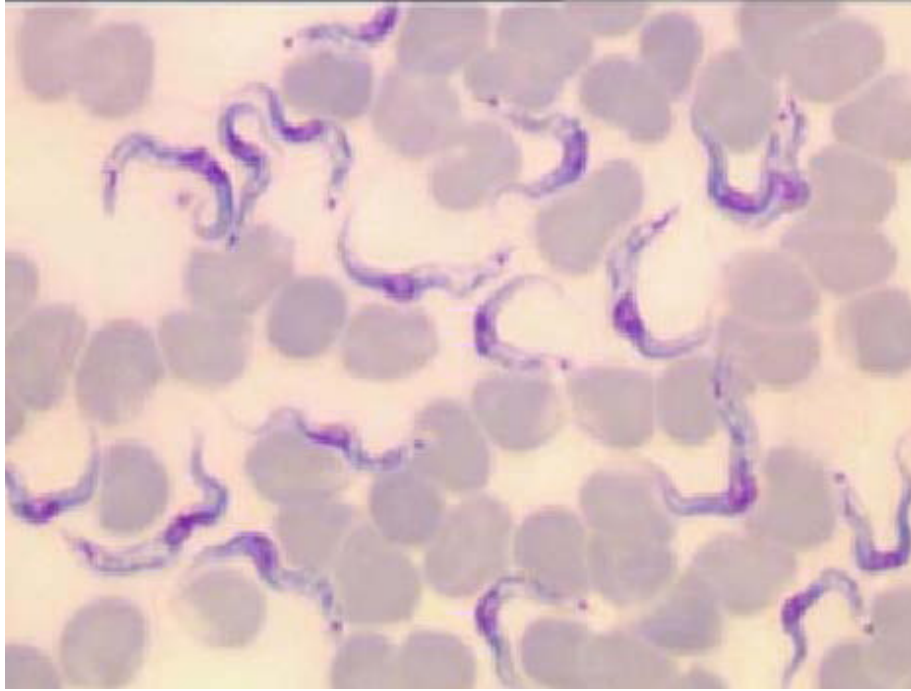


Figure N° 3 : *T. b. gambiense* dans le sang (Laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux 2)

1.1.2.2 Architecture, particularités biologiques et métaboliques des trypanosomes

Les trypanosomes sont des protozoaires flagellés fusiformes, mis en évidence chez l'homme dans le sang, les ganglions, le liquide céphalo-rachidien, très mobiles à l'état frais. La coloration permet de visualiser un noyau central et un point postérieur à côté duquel part le flagelle (d'où son nom « kinétoplaste », donné à cet organite, qui représente en fait le noyau de la mitochondrie). Leur taille varie de 12 à 42 μm de long et 1,5 à 3,5 μm de large. *T. b. gambiense*, *T. b. brucei* et *T. b. rhodesiense* sont indistinguables morphologiquement. Des techniques de PCR permettent de les différencier.

➤ Architecture cellulaire et cytosquelette

Les trypanosomes ont un corps en forme de croissant très effilé, renfermant un gros noyau central. Au voisinage du kinétoplaste/mitochondrie, part un long filament, le flagelle, qui borde latéralement le corps cellulaire en déterminant la formation d'une membrane ondulante, et se prolonge en avant du parasite (Fig. 4).

Les trypanosomes sont soumis à des contraintes environnementales très fortes, car ils doivent obligatoirement se développer au sein de deux organismes (la mouche tsé-tsé et l'hôte mammifère). Les variations morphologiques sont accompagnées par des adaptations spectaculaires du revêtement de surface et du métabolisme. Lors de son cycle cellulaire, le parasite doit aussi répliquer ses organites (noyau, mitochondrie, flagelle) et les répartir entre les deux cellules filles. Tous les changements morphologiques, ainsi que la réplication et redistribution des organites, impliquent l'utilisation de moteurs moléculaires, comme les kinésines et les dynéines. Le génome du trypanosome comprend 58 gènes codant pour des kinésines. Il est constitué d'une seule mitochondrie qui s'étend tout au long de la cellule.

Les organites tels que la mitochondrie, le Golgi, le flagelle, le corps basal et le kinétoplaste sont présents en exemplaire unique dans la cellule. Ils sont connectés via les microtubules. Il est donc clair que les réplifications et ségrégations de tous ces composants seront étroitement liées. En outre, le parasite dispose de pools génétiques différents, les matériels génétiques du noyau et ceux du kinétoplaste/mitochondrie (Woodward *et al.*, 1990).

➤ Flagelle

Le trypanosome est un modèle de choix pour l'étude du flagelle puisque sa structure de base est conservée. Le flagelle est un organite plurifonctionnel nécessaire à la survie du parasite au sein des divers environnements qu'il rencontre lors de son cycle de développement. Outre son rôle moteur, il permet à la cellule de s'attacher à l'épithélium des glandes salivaires de

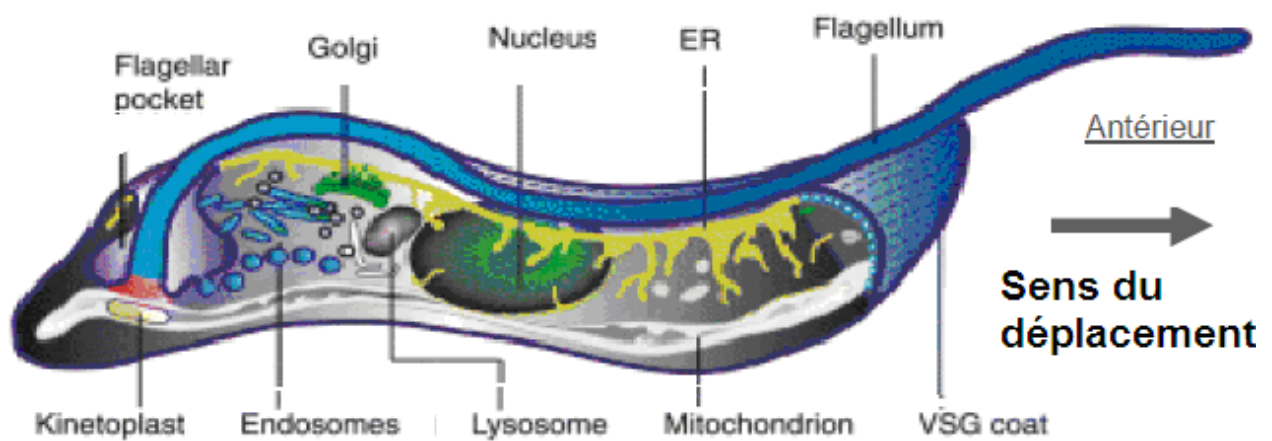


Figure N°4 : Morphologie générale d'un trypanosome (Overath et Engstler, 2004)

l'insecte. Il est également requis pour le bon positionnement des organites, la morphogenèse et la division cellulaire. Le flagelle du trypanosome, organe cylindrique, est composé d'un axonème (environ 250 protéines dont 40 identifiées) riche en dynéines, impliqués dans la mobilité de flagelle et aussi dans la croissance et la multiplication du parasite (Springer *et al.*, 2011).

50 gènes codant des protéines flagellaires potentielles ont été identifiés jusqu'à ce jour. Les trypanosomes se servent de plusieurs activités du flagelle pour des processus morphogénétiques telle que la définition de la polarité cellulaire ou le positionnement des organites.

Les parasites peuvent prendre plusieurs formes selon le stade de maturation et l'organisme qui les héberge. Dans le sang des mammifères, on le trouve sous la forme trypomastigote qui englobe les formes courtes ou « stumpy » trypomastigote infectantes pour la glossine et les formes longues ou « slender » de multiplication (Fig. 5). Dans le tube digestif de l'insecte vecteur, ils se recouvrent d'un manteau protecteur constitué de Procycline, protéine qui les protège contre les enzymes digestives de l'insecte (Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Dans l'organisme hôte, les trypanosomes se couvrent au préalable d'un manteau constitué d'une

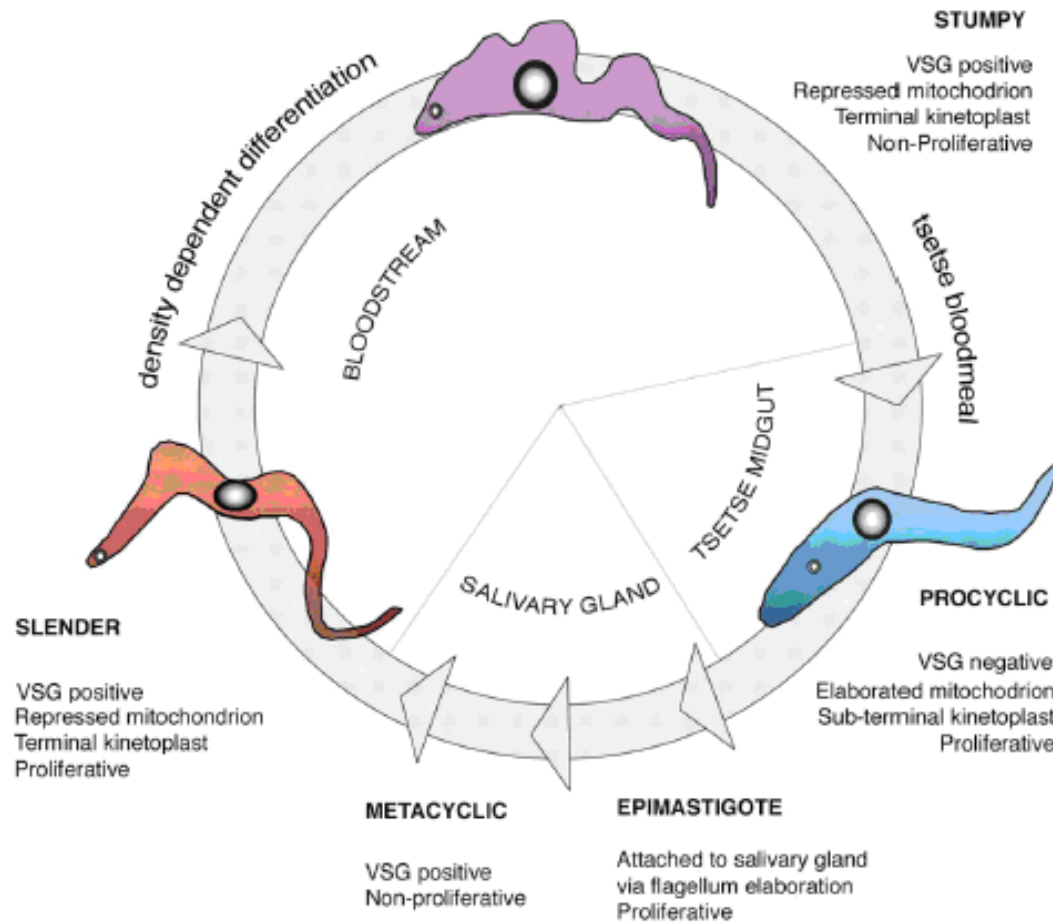


Figure N° 5 : Cycle de vie de *T. b. brucei*

(<http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/kmatthews/>) (Sept.2013)

protéine unique appelée VSG (Variant Surface Glycoprotein) pour se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. Le trypanosome remplacera ce manteau périodiquement par un mécanisme appelé variation antigénique.

➤ Particularités biologiques et métaboliques des trypanosomes

Les trypanosomes africains présentent des particularités biologiques et métaboliques retrouvées chez tous les membres de l'ordre des Kinetoplastida :

❖ La synthèse d'un analogue de glutathion appelé trypanothione

Le bis (glutathion) spermidine (trypanothione) est produit exclusivement chez des parasites de l'ordre Kinetoplastida, à partir de glutathion et de spermidine. Il remplace le système glutathion/glutathion réductase. Les trypanosomes sont très sensibles au blocage de la synthèse des polyamines, particulièrement à celle de la spermidine (Fairlamb *et al.*, 1985).

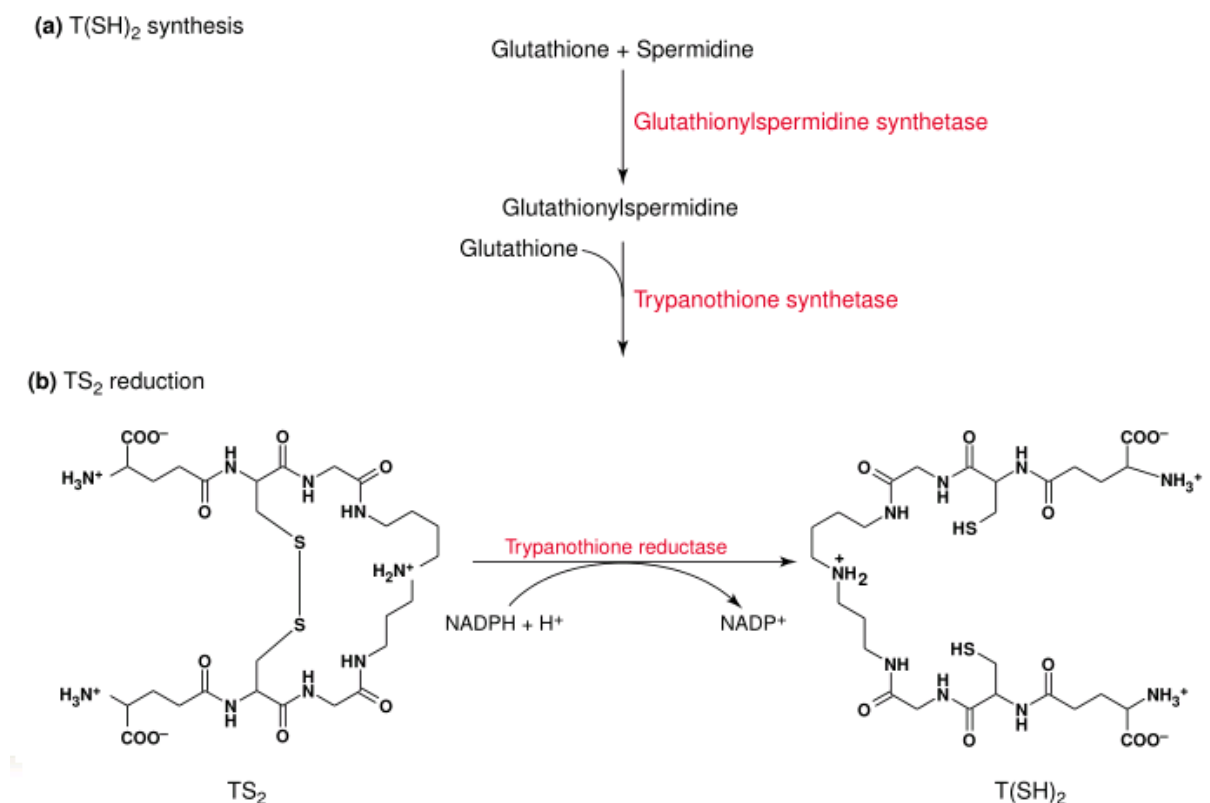


Figure N° 6 : Métabolisme du trypanothione [T(SH₂)] ((a) Synthèse de [T(SH₂)] par la conjugaison de spermidine avec deux molécules de glutathion, (b) réduction de trypanothione disulfure par trypanothione réductase et NADPH +H⁺ (Müller *et al.*, 2003).

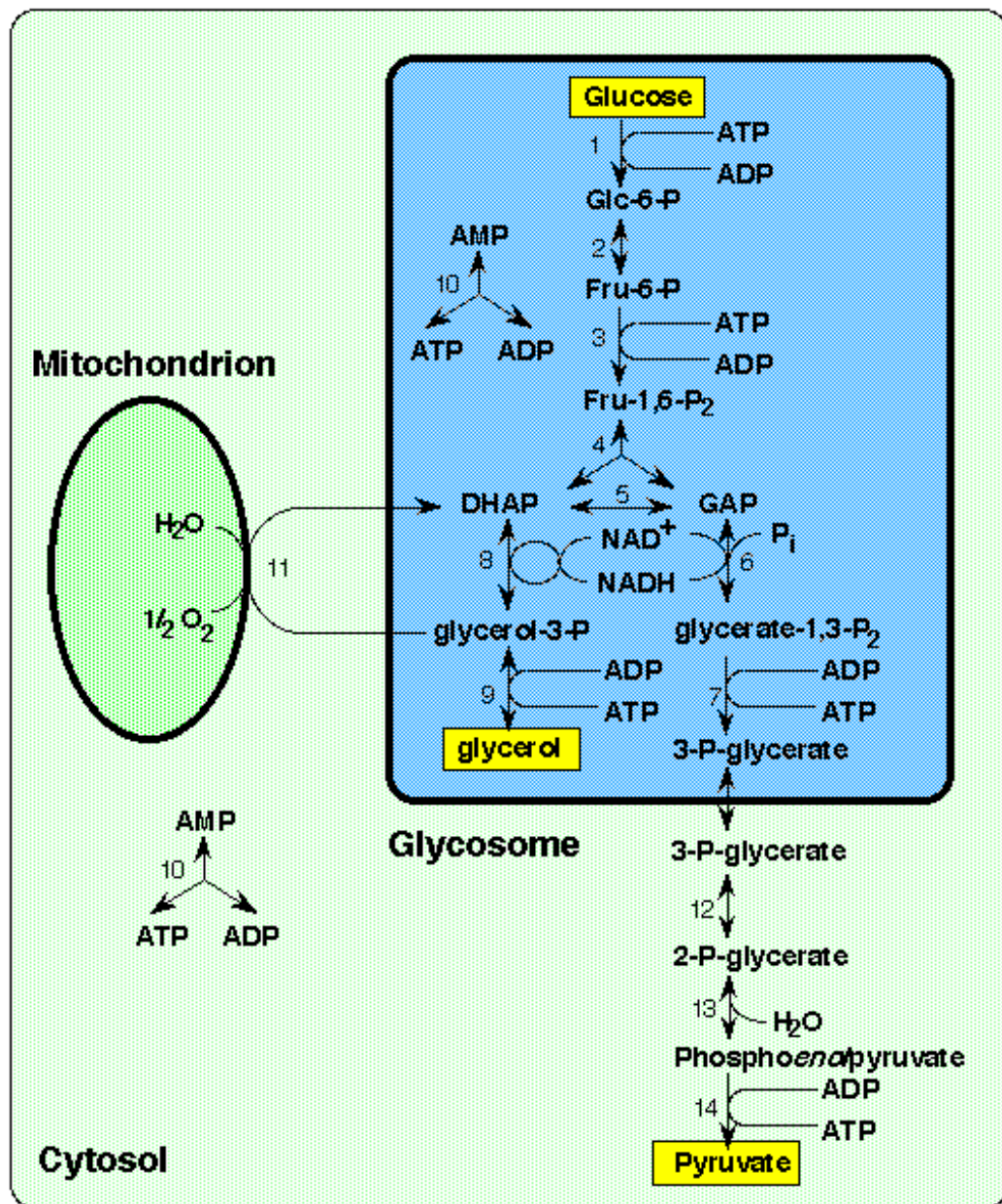


Figure N° 7 : Glycolyse dans le glycosome et cytosol

(<http://www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/glycol.htm>)

La trypanothione réductase produit des groupements thiols qui fournissent des équivalents réducteurs pour la synthèse des précurseurs d'ADN chez les trypanosomes (Dormeyer *et al.*, 2001). La trypanothione est un réducteur jouant un rôle dans la défense contre le stress oxydatif, le maintien du potentiel redox, la détoxification et la réduction des peroxydes (Krauth-Siegel *et al.*, 2003 ; Manta *et al.*, 2013).

❖ La présence d'un organite appelé glycosome

Chez les Trypanosomatidae, les principales étapes de la glycolyse sont réalisées dans un organite apparenté aux péroxysomes : le glycosome.

En plus des enzymes de la glycolyse, le glycosome contient aussi des enzymes ; glycosyltransférase nécessaire à la synthèse des glycoprotéines (Marino *et al.*, 2010), aldose-1-épimérase qui assure la conversion réversible de formes α et β des sucres (Colasante *et al.*, 2006), l'arginine kinase qui réalise la phosphorylation de l'arginine en N(omega)-phospho-L-arginine (Colasante *et al.*, 2006 ; Vertommen *et al.*, 2008) et d'autres enzymes.

❖ Une seule mitochondrie renfermant le kinétoplaste

L'unique mitochondrie, ramifiée dans tout le cytoplasme, renferme l'ADN extra-chromosomique à la base du flagelle dans une zone appelée kinétoplaste (noyau de la mitochondrie), autrefois considéré comme l'organite à l'origine du mouvement du flagelle du parasite. Le kinétoplaste constitue le support génétique des adaptations métaboliques aux différents milieux dans lesquels le parasite évolue. Il est constitué de 2 types de molécules d'ADN circulaire : les maxi-cercles (au nombre de 10 à 30) et les mini-cercles (5000 à 10 000) entrelacés les uns dans les autres, constituant ainsi un réseau complexe et compact (Simpson, 1987).

Une autre particularité est liée au fait que la maturation des ARNm mitochondriaux se réalise par addition et délétion de résidus uridine, impliquant un mécanisme appelé « édition des ARN ». En outre, la maturation de tous les ARNm cytosoliques par addition d'un oligonucléotide de 39 résidus à leurs extrémités 5', ce qui implique un mécanisme de trans épissage (Nilsen *et al.*, 1995).

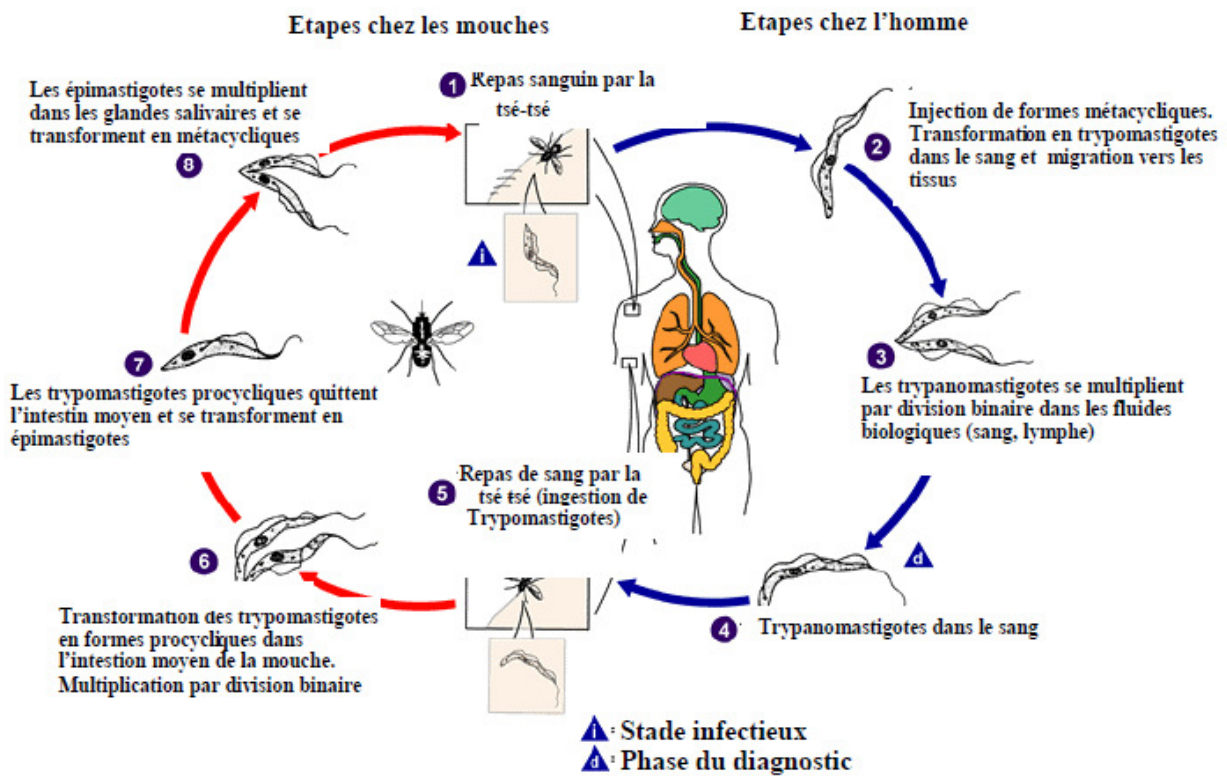


Figure N°8 : Cycle du trypanosome humain (d'après Centers for Diseases Control, CDC, www.cdc.gov/)

1.1.2.3 Cycle de développement du parasite

Les trypanosomes ingérés par l'insecte vecteur au cours d'un repas sanguin sur un hôte infecté se transforment dans l'intestin de la glossine en trypomastigotes procycliques (forme non infectante) et se multiplient par scissiparité ; au stade procyclique, les trypanosomes évoluent dans le tube digestif de l'insecte, environnement basique et riche en protéases. A ce stade, le manteau protecteur du parasite est constitué de Procycline, cette protéine protège le parasite contre les enzymes digestives de l'insecte (Acosta-Serrano *et al.*, 2001). Ils quittent l'intestin, se transforment en épimastigotes puis migrent vers les glandes salivaires où ils se transforment en trypomastigotes métacycliques infectants entourés d'un manteau protéique antigénique correspondant à la forme infectante pour l'homme. Les trypanosomes sont alors susceptibles d'être inoculés à un mammifère au niveau du tissu cutané par la piqûre du vecteur (Fig. 8). Le temps de maturation chez la glossine est de 21 jours. Au cours d'un nouveau repas sanguin, la glossine infectée injecte les trypomastigotes métacycliques dans le tissu cutané du sujet. Un chancre d'inoculation se forme au niveau de la peau, le trypanosome se couvre au préalable d'un manteau constitué d'une protéine unique appelée VSG (Variant Surface Glycoprotein) pour se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. Le trypanosome remplacera ce manteau périodiquement par un mécanisme appelé variation antigénique. Ils entrent alors dans le système lymphatique et passent dans la circulation sanguine où ils se transforment en trypomastigotes circulants dans le sang ; ils diffusent dans l'ensemble de l'organisme et atteignent d'autres fluides biologiques (par exemple, lymphe, liquide céphalo-rachidien), et continuent de se répliquer. Dans le sang des mammifères, le parasite est confronté au système immunitaire de son hôte.

1.1.3 Agent vecteur

Les glossines sont exclusivement des insectes africains. Le mode de répartition des espèces de glossine résulte principalement de l'existence de barrières climatiques (déficit en hygrométrie trop important et des températures trop élevées au nord ou trop faibles au sud) et écologiques (végétation, ainsi que la possibilité de disposer de sources de nourriture) qui limitent leur propagation sur le continent africain. Les gîtes à tsé-tsé dépendent essentiellement des conditions climatiques et hygrométriques mais aussi de la fréquentation par l'homme et les animaux. Deux horizons africains d'écologie différente se partagent le domaine de l'affection et correspondent à deux biotypes de mouches :

- *Glossina palpalis*, insecte hygrophile et hydrophile qui affectionne les épaisses forêts chaudes et très humides du bassin du Congo ou à proximité des rivières où poussent arbres et broussailles. Elle inocule à l'homme *T. b. gambiense*,

- *Glossina morsitans*, espèce xérophile présente dans les vastes savanes arborescentes, chaudes et surtout beaucoup plus sèches de l'Est africain où les grands gibiers paissent par troupeaux entiers. Elle inocule à l'homme et aux animaux sauvages *T. b. rhodesiense* (Anderson *et al.*, 2011).



Photo N° 1 : Mouche tsé-tsé (<http://enciclopediadeanimalesvirtual.blogspot.fr/2010/09/mosca-tse-tse.html>) (Juin 2013)

Toutefois, là où l'on pourrait penser que la température est trop basse, il peut tout de même y avoir présence de tsé-tsé en raison de l'abondance du gibier. Le facteur nourriture est la première cause de la restriction de l'aire de distribution des tsé-tsé d'un point de vue quantitatif et qualitatif. En zone de savanes, on trouve principalement des tsé-tsé près des lieux de baignades utilisées pour la pêche et les activités ménagères et sur les ponts et zones de gué. En zone forestière, les insectes vont s'installer de préférence dans les bas-fonds humides, partout où l'ombre et l'humidité sont constantes, mais ils peuvent également suivre les déplacements de population humaine et s'installer aux lisières des villages où ils peuvent se nourrir presque exclusivement sur les humains. Par ailleurs, nous pouvons constater que la répartition des espèces de glossines est superposée à la carte de répartition de la maladie.

1.1.4 Symptomatologie et Tableau clinique de la Trypanosomose Humaine Africaine

La maladie se transmet essentiellement par la piqûre d'une mouche tsé-tsé infectée. Le trypanosome peut aussi franchir la barrière placentaire et infecter le fœtus (la contamination mère-enfant). Environ huit à dix jours après la piqûre infectante de la glossine, l'homme développe un chancre d'inoculation (ou trypanome) sous forme d'un furoncle sans tête contenant des nombreuses formes parasitaires monomorphes de type long et effilé ; la piqûre de la glossine passe souvent inaperçue au milieu des multiples agressions en milieu tropical. Après une période asymptomatique de plusieurs semaines ou mois, l'évolution de la maladie se fait en deux phases, les trypanosomes se multiplient dans les tissus sous-cutanés, dans le système sanguin et lymphatique ; on parle alors de phase lymphatico-sanguine (ou phase de généralisation), premier stade de la maladie ou encore phase I. Ensuite le parasite franchit la barrière hémato-encéphalique et envahit le système nerveux central. On parle alors de phase neurologique (ou phase de polarisation cérébrale) encore appelée phase II.

1.1.4.1 Phase Lymphatico-sanguine ou Phase I

Après la piqûre infectante, une réaction inflammatoire locale se développe, le chancre d'inoculation (Photo 2). La phase lymphatico-sanguine lui succède rapidement.



Photo N° 2 : Chancre d'inoculation trypanosome (<http://umvf.campus-parasitologie-mycologie/cycle2/poly/3100ico.html>)

La fièvre évolue sous forme de pics élevés et correspond à l'envahissement de l'organisme par le parasite, à la production du TNF- α et aux phases de variations antigéniques.

Les trypanosomes se multiplient dans le sang et dans le système lymphatique. Les anticorps circulants vont alors lyser cette première population de trypanosomes. Une mutation survient chez quelques parasites qui modifient la structure de leur antigène de surface leur permettant d'échapper à l'action des anticorps. La multiplication des mutants (ou variants antigéniques) va donner une deuxième population parasitaire qui, à son tour, subira la lyse et une mutation chez quelques uns. Cette phase peut durer des années dans le cas de la trypanosomose à *T. b. gambiense* (Chimelli *et al.*, 1997). Les symptômes apparaissent de manière très variable entre 1 et 3 semaines après la piqure infectante. Les premiers symptômes restent malgré tout non spécifiques : il s'agit de la fièvre d'évolution anarchique qui est le symptôme le plus constant, des céphalées et des asthénies sont souvent associées, accompagnés d'arthralgie, de malaise, d'une perte de poids, et d'adénopathies précoces, indolores, mobiles, souvent peu volumineuses touchant les ganglions cervicaux et sus-claviculaires. Le prurit est le signe cutané le plus fréquent, les oedèmes de la face donnent un aspect lunaire et très évocateur. L'atteinte cardiovasculaire plus sévère est observée dans la THA à *T. b. rhodesiense* et se traduit le plus souvent par une chute de la tension artérielle, un assourdissement des bruits du cœur ou une arythmie cardiaque. D'autres signes sont parfois rapportés, à savoir, les crampes, courbatures et troubles digestifs, insomnie nocturne, réflexes anormaux. Par ailleurs, aucun symptôme ou groupe de symptômes n'est pathognomonique de la THA (Louis *et al.*, 2001) et ne permet pas d'entreprendre un traitement d'épreuve comme cela se fait dans d'autres affections.

1.1.4.2 Phase II ou phase de polarisation cérébrale ou méningo-encéphalitique

En général, elle correspond à l'apparition des signes et autres symptômes manifestes de la maladie: modification du comportement, état confusionnel, troubles sensoriels et mauvaise coordination, des troubles de la vigilance, en particulier des troubles du sommeil.

- **Des troubles moteurs, du tonus, des réflexes** : se traduisent par des tremblements, des mouvements anormaux, des troubles de la coordination (démarche ébrieuse, incoordination totale) et d'hyper réflectivité, cette phase peut évoluer vers une crise convulsive.
- **Des troubles sensitifs** : caractérisés par une hyperesthésie cutanée et profonde (signe de la clé de Kérandel).
- **Des troubles psychiatriques** : caractérisés par des hallucinations, des comportements imprévisibles, asociaux, troubles de l'humeur (indifférence, excitation).

- **Des troubles du sommeil** : Les troubles du sommeil, à l'origine du nom de la maladie, sont une caractéristique importante de la deuxième phase. On assiste à une disparition du rythme circadien, alternance d'insomnies, de somnolences paroxystiques et l'alternance veille-sommeil en cycles d'autant plus courts que les malades sont plus gravement atteints. Elle aboutit à la cachexie sommeilleuse terminale, au coma et à la mort.

La physiopathologie liée à des troubles du sommeil n'est pas encore totalement élucidée. Les données disponibles montrent que l'atteinte du cycle veille-sommeil devrait être liée à des molécules libérées par les trypanosomes et/ou par la réponse de l'hôte. Les réactions inflammatoires provoquées par les trypanosomes dans les structures hypothalamiques peuvent conduire à des dysfonctionnements de l'horloge biologique (Lundkvist *et al.*, 2004). Les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL - 1 β et TNF- α , fortement induites au cours des trypanosomoses humaines interviennent dans la dysrégulation veille/sommeil (Rhind *et al.*, 1999 ; Lundkvist *et al.*, 2004) et également chez les rongeurs de laboratoire (Quan *et al.*, 1999). Cet effet est peut-être médié par la prostaglandine D2 et E2 (Hayaishi *et al.*, 1995) et / ou l'oxyde nitrique et d'autres radicaux libres (Kapas *et al.*, 1994). Par contre les cytokines anti - inflammatoires provoquent de l'insomnie (Krueger *et al.*, 2003)

1.1.4.3 Formes cliniques

La maladie se rencontre sous deux formes, selon le parasite en cause, *T. b. gambiense*, en Afrique centrale et occidentale , provoque une atteinte chronique qui peut se prolonger sous une forme passive pendant des mois ou des années, avant que les symptômes apparaissent, évoluent tardivement jusqu'au stade cachectique mortel. *T. b. rhodesiense* est à l'origine d'une forme aiguë de la maladie en Afrique méridionale et orientale. L'infection débute en quelques semaines, est plus virulente et aiguë et se développe plus rapidement avec atteinte cardiaque (myocardite) et rénale (protéinurie), d'évolution rapidement fatale.

1.1.4.4 Trypanosomoses atypiques

Il existe des trypanosomoses humaines atypiques liées au développement chez l'homme de trypanosomes provenant d'animaux (Truc *et al.*, 2013). 19 cas de trypanosomoses humaines atypiques causées par *T. b. brucei* (Hoare, 1972 ; Deborggraeve *et al.*, 2008), *T. vivax* (Hoare, 1972), *T. congolense* (Truc *et al.*, 1998), *T. evansi* (Gill, 1977 ; Joshi *et al.*, 2005) et *T. lewisi*

(Johnson, 1993 ; Doke et Kar, 2011), autrefois considérés comme non-infectieux pour l'homme, ont été rapportés. Au cours de ces dernières années, *T. evansi* et *T. lewisi* ont émergé comme potentiellement pathogènes pour l'homme. Certains cas ont été identifiés par l'observation microscopique des trypanosomes, d'autres par des techniques de biologie moléculaire. Le passage à l'homme des trypanosomes d'origine animale serait lié en partie à un manque d'activité trypanolytique du sérum due à des mutations de l'ApoL-I. Une déficience en ApoL-1 a été mise en évidence chez un sujet infecté par *T. evansi* (Vanhollebeke *et al.*, 2006)

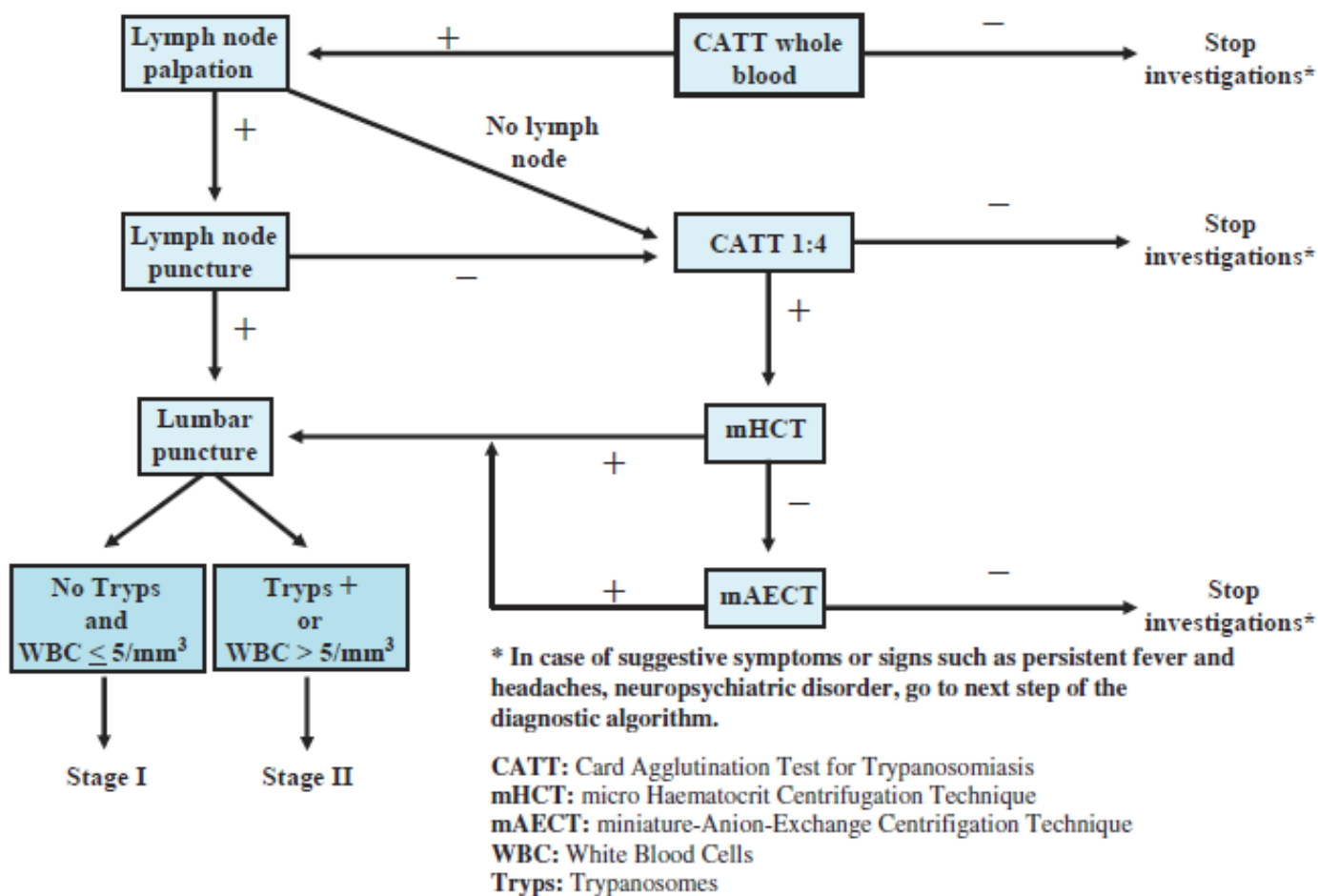


Figure N° 9 : Algorithme de diagnostic de la THA utilisé par Médecins Sans Frontières dans le Nord Est de la RDC en 2011 (Malvy *et al.*, 2011).

1.1.5 Diagnostic et prise en charge thérapeutique

1.1.5.1 Diagnostic

Le diagnostic clinique de la THA est délicat devant des symptomatologies apparentes et communes à plusieurs pathologies et non spécifiques à la THA. Cependant les signes cliniques n'ont qu'une valeur d'orientation pour poser un diagnostic biologique. Le diagnostic biologique est souvent pratiqué sous forme de campagne de prospection active et commence toujours par des tests sérologiques puis des techniques parasitologiques, qui sont des techniques permettant de rechercher le parasite dans le sang, la lymphe ou le LCR. La biologie moléculaire est utilisée au laboratoire dans le cas de la confirmation ou de la recherche.

❖ Diagnostic immunologique

Le diagnostic immunologique repose sur la mise en évidence des anticorps dirigés principalement contre le VAT (variable antigène type), qui est un composant de la glycoprotéine variable de surface (VSG). Parmi ces tests, nous avons : le CATT (Card Agglutination Test for human Trypanosomiasis), l'ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), l'immunofluorescence.

➤ CATT (Card Agglutination Test for human Trypanosomiasis)

Le principal test immunologique utilisé est le test d'agglutination appelé CATT (Card Agglutination Test for human Trypanosomiasis) (Fig. 9). Ce test d'agglutination sur carte pour la THA causée par *T. b. gambiense* (CATT / *T. b. gambiense*) est actuellement appliqué au dépistage de masse de la population à risque en Afrique occidentale et centrale. Il consiste à la détection dans le plasma, sérum ou le sang, de la présence d'un anticorps dirigé contre le VAT LiTat 1.3, qui est un antigène variable représentatif des différentes souches. La technique CATT donne quelques fois des réactions croisées. Cependant des variations de sensibilité et spécificité du test en fonction du pays et du foyer de la maladie en diminuent sa valeur diagnostique (Louis *et al.*, 2001). La technique CATT est améliorée en plusieurs dérivés qui sont en cours d'expérimentation.

➤ Test ELISA

Le diagnostic immunoenzymatique de la THA utilise un conjugué marqué à la peroxydase et une protéine ou un peptide de *T. b. gambiense* ou *T. b. rhodesiense* comme

antigène. Une technique a été proposée pour l'espèce *T. b. gambiense* avec la combinaison d'antigène de VSG LitTat 1.3, 1.5 et 1.6 (Van Nieuwenhove *et al.*, 2011). L'exemple de la mise en évidence dans les sérums des malades de la THA d'un anticorps dirigé contre un épitope tryptophan like présent dans le VSG permettant la synthèse d'un antigène artificiel à base de l'haptène tryptophane (Semballa *et al.*, 2007) est une avancée dans l'amélioration de la technique ELISA ou de la technique chromatographique pour le diagnostic.

➤ **Test sur bandelette**

Le développement d'un prototype d'écoulement latéral pour détecter *T. b. gambiense* est une technique qui peut rapidement détecter des quantités de l'ordre du nanogramme d'anticorps ou d'antigènes dans des échantillons de sang au bout du doigt, sans avoir besoin de tout le matériel auxiliaire. Il est une combinaison de technique ELISA et chromatographique permettant le diagnostic rapide dans une prospection active. Il est basé sur l'utilisation d'un support sur lequel est fixé un conjugué contenant l'antigène du parasite. Lorsque le sérum du patient est déposé, l'anticorps dirigé contre le parasite va former un sandwich avec le conjugué. L'accumulation de ce sandwich d'anticorps spécifique génère une ligne visible à l'œil (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009 ; Sullivan *et al.*, 2013). Cette technique est en cours d'expérimentation sur le terrain.

❖ **Diagnostic parasitologique**

Le diagnostic parasitologique est la clé du diagnostic. Pour *T. b. rhodesiense*, la mise en évidence du trypanosome repose sur un examen microscopique direct du sang frais (frottis sanguins, gouttes épaisses), de la lymphe, du LCR. Dans le sang, l'observation est faite directement sur l'échantillon, et les parasites apparaissent mobiles et fusiformes. L'observation peut être faite à l'état frais au microscope ou après simple ou double centrifugation.

Par contre, la plupart des patients parasités par *T. b. gambiense* présentent une parasitémie faible, et la mise en évidence des parasites est difficile. Les méthodes de concentration des parasites deviennent donc nécessaires. La centrifugation en tube capillaire (CTC, technique de Woo) est très utilisée. La goutte épaisse colorée au Giemsa permet aussi une visualisation des parasites. La technique de concentration la plus efficace repose sur le passage à travers une colonne de DEAE cellulose, et centrifugation de l'éluat. Plusieurs modifications ont augmenté la sensibilité de cette technique.

La microscopie à fluorescence (FM) est connue pour augmenter la sensibilité, la rapidité et la facilité de la démonstration de trypanosomes. Dans la technique QBC (couche leucoplaquettaire quantitative), le sang est recueilli dans des tubes capillaires contenant de l'acridine orange et examiné à l'aide d'un microscope à fluorescence et d'un support particulier. La mise en œuvre de la méthode QBC a cependant été difficile pour la THA, en raison du coût élevé de l'équipement et de la difficulté d'approvisionnement.

Les seuils de détection des trypanosomes sont très variables selon la technique utilisée : 10 000 T/ml pour un frottis de sang examiné à l'état frais, 5000 T/ml pour une goutte épaisse colorée en Giemsa, 500 T/ml pour la centrifugation en tube capillaire, moins de 500 T/ml pour QBC® test et 100 T/ml pour la mini colonne échangeuse d'ions (Louis *et al.*, 2001).

❖ **Technique de Biologie moléculaire**

Le développement de la détection de l'ADN du trypanosome par des techniques de PCR constitue une amélioration significative au test de diagnostic actuel. Mais son application est limitée aux laboratoires de recherche, et non sur le terrain. Par ailleurs, une variante de PCR classique, simple, utilisable sur le terrain est mise au point depuis quelques années. L'Amplification isotherme (LAMP : Loop-mediated isothermal amplification) de l'ADN montre une grande sensibilité et spécificité. Le gène spécifique de chaque espèce est utilisé pour la détection.

Dans l'exemple du *T. b. rhodesiense* le gène SRA spécifique à cette espèce est utilisé pour détecter l'ADN du parasite après un traitement thermique. L'échantillon est soumis à 62 ° C pendant 1 h, en utilisant six amorces qui reconnaissent huit cibles. Les amplicons obtenus sont détectés à l'aide de SYTO-9 colorant fluorescent dans un thermocycleur en temps réel ; l'observation visuelle se fait après l'ajout de SYBR Green I. Le test LAMP SRA a une limite de détection absolue d'un seul pg d'ADN purifié (équivalent à 10 trypanosomes / ml) et 0,1 pg (1 trypanosome / ml) (Njiru *et al.*, 2008).

❖ **Méthode d'inoculation *in vivo***

Elle consiste à inoculer à des animaux réceptifs (Souris, rat) du matériel biologique provenant de l'homme. La méthode est plus sensible pour *T. b. rhodesiense* que pour *T. b. gambiense*.

❖ Diagnostic de phase

Le diagnostic de phase ou stade (phase 1 ou 2) est obligatoire avant une prise en charge thérapeutique, car l'algorithme de traitement varie suivant les phases. Le diagnostic de la phase 2 (neurologique) repose sur la ponction lombaire. Sur le LCR recueilli, deux paramètres sont utilisés sur le terrain : la cytorachie > 10 cellules/ μL , la recherche directe du parasite dans le LCR. Classiquement : stade 1 < 10 cellules/ μL , stade 2 > 10 cellules/ μL . Mais actuellement, une cellularité > 5 cellules/ μL doit faire classer le malade au stade 2. L'algorithme de décision varie selon les Programmes Nationaux de Lutte contre la THA (PNLTHA). La protéinorachie > 37 mg/100 mL est également utile, lorsqu'elle peut être réalisée.

Une autre technique de diagnostic de phase repose sur la recherche des lymphocytes B dans le LCR, basée sur la détection d'un marqueur spécifique de LB, le CD19 par un anticorps spécifique conduisant à la formation des rosettes (Bouteille *et al.*, 2010). La recherche de l'anticorps anti-galactocérébroside dans le LCR a également été effectuée (Girard *et al.*, 2000).

1.1.5.2 Prise en charge thérapeutique

Comme le diagnostic, le traitement de la THA est complexe et nécessite un personnel ayant une compétence particulière. Les médicaments disponibles sont parfois toxiques, inefficaces et leur utilisation se heurte aux mécanismes de résistance élaborés par le parasite. La liste de ces médicaments est présentée dans le tableau ci-dessous.

Tableau N° 1 : Description des principaux traitements actuellement utilisés dans la THA

Produit	Nom Commercial	Classe moléculaire	Dose Usuelle mg/Kg/j	Mode d'administration	Mécanisme d'action	Indication
Suramine	Germanin® (Bayer)	Naphtylamine Polysulphonate	20	Voie parentérale	Inhibition des enzymes de la glycolyse	Stade 1 (<i>T. b. rhodesiense</i>)
Pentamidine	Pentacarinat® (Aventis)	Diamine aromatique	4	Voie parentérale	Inhibition de la S- adénosylmethionine décarboxylase	Stade 1 (<i>T. b. gambiense</i>)
Mélarsoprol	Arsobal® (Sanofi)	Dérivé arsenical	3,6	Voie parentérale	Inhibition de trypanothione reductase et pyruvate kinase	Stade 2 (<i>T. b. gambiense</i> rechute et <i>T. b. rhodesiense</i>)
Eflornithine	Ornidyl® (Sanofi)	Analogue structural de l'ornithine (DiFluoroMéthylOrnithine ou DFMO)	400	Voie parentérale	Inhibition de l'ornithine décarboxylase chez le parasite	Stade 2, rechute (<i>T. b. gambiense</i>)
Combinaison Nifurtimox + Eflornithine	Lampit® (Bayer)	Nitrofurane DFMO	15 400	Voie orale Voie parentérale	Production du stress oxydatif chez le parasite	Stade 2, (<i>T. b. gambiense</i>)
Fexinidazole (essai clinique Sanofi, DNDi)		Nitroimidazole	100	Voie orale		Stades 1 et 2 <i>T. b. gambiense</i>

En raison de la complexité du parasite et de son mécanisme d'adaptation, l'arsenal thérapeutique doit être mis à jour continuellement. Ainsi, entre 2002 et 2003, un traitement combiné plus simple, plus sûr, et plus efficace pour traiter la THA au stade 2 est mis en expérimentation clinique : il s'agit de la Combinaison Thérapeutique à base de Nifurtimox-eflornithine (NECT) (Priotto *et al.*, 2009). Ces associations thérapeutiques permettent généralement de réduire les doses de médicaments, un point spécialement important lorsque les médicaments sont toxiques, et de réduire la durée du traitement. Elles sont plus faciles à administrer et offrent une certaine protection contre l'apparition de résistances. Après évaluation des données cliniques issues de l'essai clinique de NECT, la combinaison est mise sur le marché et fait partie intégrante de l'algorithme de traitement de la THA à *T. b. gambiense* des programmes nationaux de lutte contre la THA (PNLTHA) des pays touchés.

Une molécule de la famille de 5-nitro-imidazole, le fexinidazole, connue pour son activité trypanocide depuis plus de 30 ans, présente un profil intéressant, étant efficace à la fois contre le stade 1 et 2 de la THA, et administrable par voie orale (Torreele *et al.*, 2010). Des essais cliniques sont en cours dans les foyers de la République Démocratique du Congo, de la République Centrafricaine et de la République du Congo.

D'autres molécules candidates à l'exemple de oxaboroles déjà actifs sur la trypanosomose sud américaine, sont au stade d'évaluation pré-clinique (Nare *et al.*, 2010).

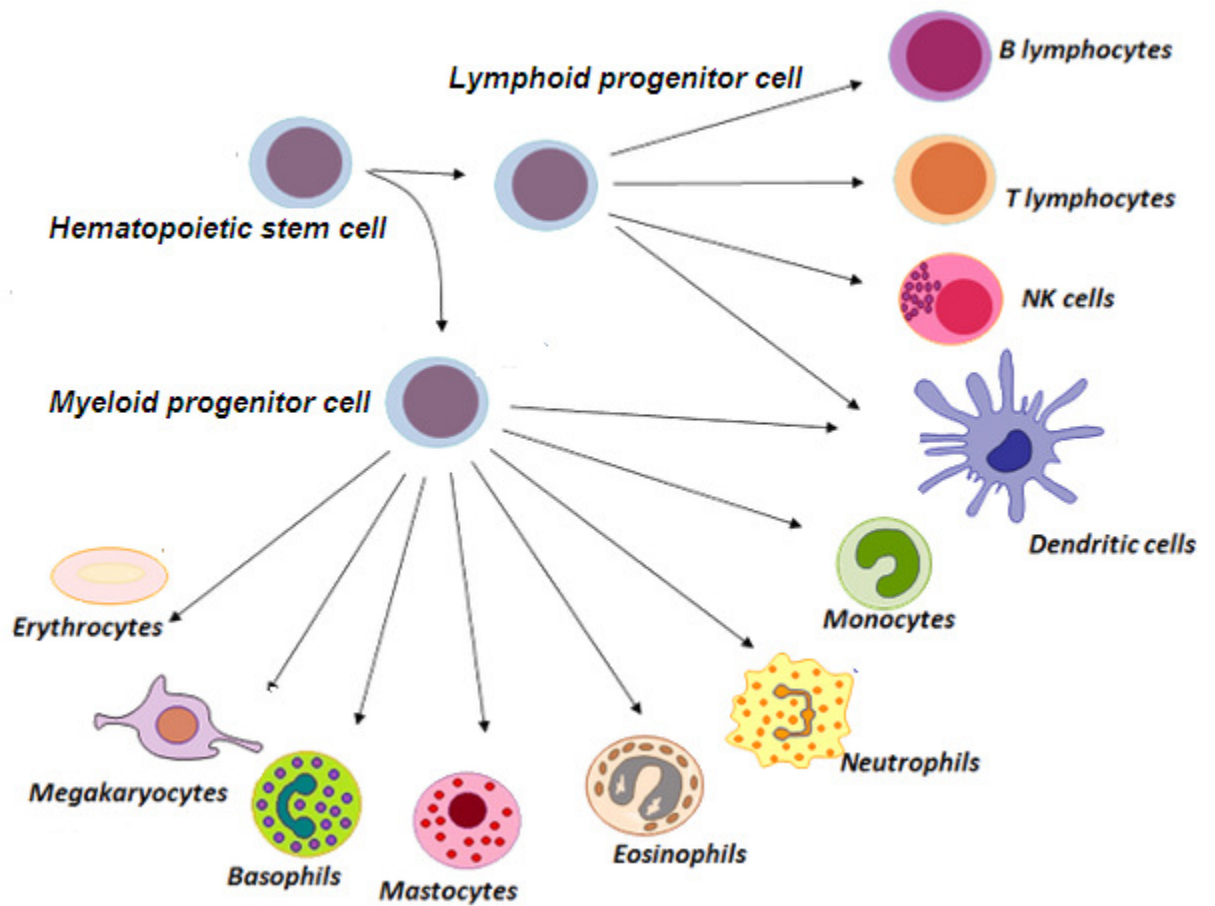


Figure N° 10 : L'hématopoïèse cellule souche et progéniteurs et cellules sanguines

<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/MEIS1ID41331ch2p14.html> (Oct 2013)

1.2 Aspects Immunophysiopathologiques de la THA

Le système immunitaire a pour but principal, la reconnaissance du soi et du non soi. Ses différents éléments coopèrent et agissent en synergie pour éliminer les agents agresseurs ou leurs conséquences, ce qui nécessite des mécanismes de régulation très précis.

Les parasites contournent, détournent et dérèglent les éléments, principalement cellulaires du système immunitaire, et donc s'installent dans l'organisme en y provoquant des désordres immunopathologiques, que nous verrons après un rappel du système immunitaire.

1.2.1 Rappels Immunologiques

1.2.1.1 Hiérarchie Hématopoïétique

Toutes les cellules de la population sanguine dérivent d'un même progéniteur cellule souche pluripotente présente dans la moelle osseuse. En fonction des facteurs de croissance, des signaux et de l'environnement stromal, la cellule souche se différencie pour donner les progéniteurs myéloïdes et progéniteurs lymphoïdes (Fig. 10).

➤ Progéniteurs myéloïdes

Les progéniteurs myéloïdes, en fonction des stimuli, donnent des érythrocytes, des mégacaryocytes qui évoluent en plaquettes, des polynucléaires (basophile, éosinophile et neutrophile), et des monocytes. Les monocytes sont libérés vers le sang où ils ont une demi-vie d'environ 2 à 3 jours. Sous l'influence de facteurs chimio-attractants, les monocytes circulants migrent dans les tissus où ils se différencient en macrophages dont il existe différentes populations.

Il faut distinguer les macrophages dérivés des monocytes sanguins dans un contexte inflammatoire (cellules activées), des macrophages résidents participant à l'homéostasie dans les tissus. Les monocytes peuvent aussi se différencier en cellule dendritique sous l'influence de certains stimuli. Ces cellules acquièrent certaines particularités en fonction de leur microenvironnement tissulaire ; ainsi, certains macrophages ont des capacités qui leur sont propres tout en conservant des propriétés communes comme la capacité de produire de grandes quantités de médiateurs de l'inflammation et, notamment, des cytokines pro-inflammatoires.

➤ **Progéniteurs lymphoïdes**

Le progéniteur lymphoïde se différencie en lymphoblaste qui poursuit sa différenciation dans les organes lymphoïdes primaires, à savoir, le thymus, pour la différenciation de lymphocyte T, et la moelle osseuse pour la différenciation de lymphocyte B et cellule NK.

La maturation et le développement des lymphocytes T dans le thymus correspondent à l'acquisition de leur TCR associé au CD3, plus CD4 ou CD8, et de la tolérance au soi.

Le développement des lymphocytes B se fera au niveau de la moelle osseuse à partir de la lignée lymphoïde. La maturation et le développement des lymphocytes B correspondent à l'acquisition du BCR et à l'acquisition de la tolérance au soi

Les LT et LB gagnent la circulation lymphatique et sanguine pour se loger dans les organes lymphoïdes périphériques (rate, ganglion et organes lymphoïdes associés aux muqueuses). Ils circulent dans l'organisme à la recherche des antigènes. En cas de présentation de l'antigène par une cellule présentatrice d'antigène (CPA), il va se former une synapse immunologique qui va activer les lymphocytes.

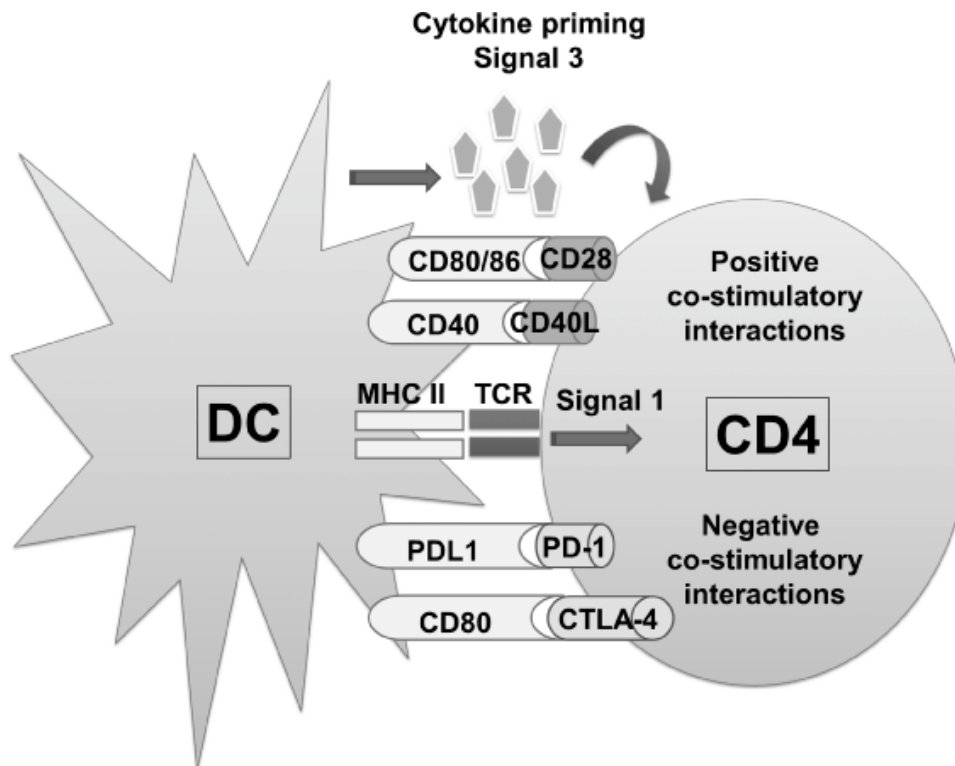


Figure N° 11 : Synapse immunologique (Liechtenstei *et al.*, 2012)

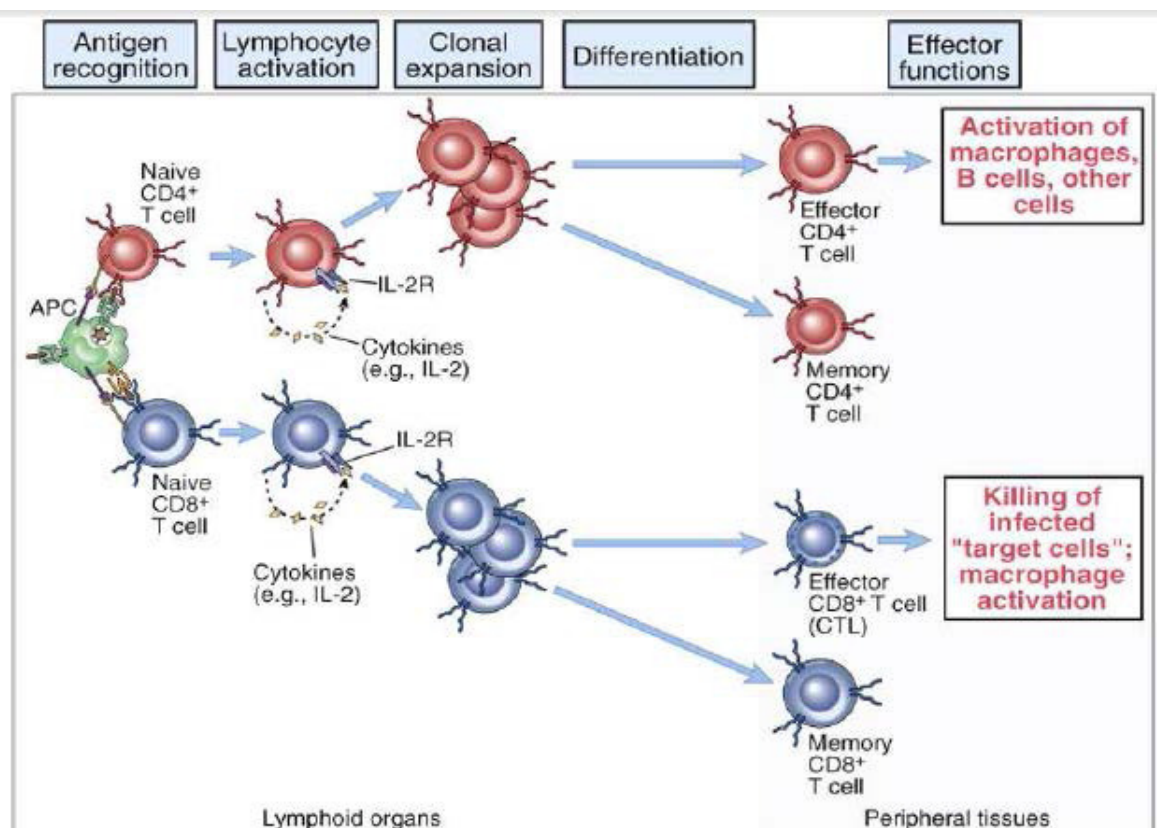


Figure N° 12 : Différenciation des cellules TCD4 et TCD8 effectrices et mémoires (Elseviet. Abbas *et al.*, Cellular and molecular Immunology 6^e WWW.studentconsult.com

1.2.1.2 La polarisation et les états d'activation des Lymphocytes T

➤ Activation des lymphocytes T naïfs

L'interaction entre les lymphocytes T naïfs et les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA) professionnelles a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T naïfs circulent continuellement vers ces organes lymphoïdes secondaires où ils arrivent par la circulation sanguine. Si le TCR reconnaît spécifiquement le complexe peptide-CMH, une forte liaison est établie, l'interaction entre le TCR et le complexe peptide-CMH ou premier signal est renforcée par les « co-récepteurs » CD4 ou CD8 (Grakoui *et al.*, 1999). D'autres molécules vont également intervenir afin d'augmenter la stabilité et la durée du premier signal, notamment des molécules d'adhésion CD2, LFA-1 et la molécule de co-stimulation CD28 (Signal 2). Le TCR est associé au complexe CD3 qui transmet un signal à l'intérieur de la cellule *via* les motifs ITAM présents dans sa partie intracellulaire. Une réorganisation du cytosquelette permet la formation d'une zone élargie de contact étroit entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène, la synapse immunologique (Fig. 11).

Un troisième signal oriente la polarisation des cellules T CD4⁺ en lymphocytes Th1/Th2/Th17 ou Treg, en fonction de l'environnement et de la nature du stimulus.

➤ Polarisation des lymphocytes T : mise en place des LT effecteurs et mémoires

La reconnaissance par le LTCD4 de l'antigène présenté par l'APC induit l'activation de lymphocytes par une série de processus aboutissant à l'expression du récepteur IL2R (CD25) et de la cytokine IL-2, qui se fixe sur leur récepteur pour engendrer l'expansion clonale suivie d'une différenciation en LTCD4 effecteur et LTCD4 mémoire. Le lymphocyte TCD4 effecteur va poursuivre sa polarisation pour aboutir à l'une des sous populations de TCD4, en fonction de stimulus et de l'environnement.

En outre, l'interaction APC/LTCD8 subit la même série de processus : activation de lymphocyte, expansion clonale et différenciation pour aboutir au LTCD8 effecteur et LTCD8 mémoire (Fig. 12).

➤ Polarisation des profils de lymphocytes T CD4⁺

Lorsqu'un lymphocyte T naïf (LTh0) est activé par la reconnaissance d'un antigène présenté par une CPA, il peut se différencier en plusieurs sous populations lymphocytaires. Au milieu des années 1980, Mosmann *et al.*, ont montré que des clones du LT murins CD4

pouvaient être divisés en deux groupes (Th1 ou Th2) suivant leur profil de sécrétion de cytokines. Ainsi, le concept de la polarisation Th1/Th2 a été étudié dans plusieurs pathologies sur le plan expérimental et s'est étendu à l'homme, et continue d'être exploré. Depuis quelques années, deux autres phénotypes de Th issus de Th0 ont fait leur apparition : il s'agit des Treg identifiés en 1995 chez la souris et entre 2001 et 2002 chez l'homme et aussi de Th17.

❖ Lymphocytes Th1

La nature de l'antigène présenté au Th0 et l'environnement en cytokines IL-12 et INF- γ va polariser le Th0 vers le phénotype Th1 qui, à son tour, va sécréter IL-2, INF- γ et TNF- α . Ce phénotype est à l'origine de l'activation classique des macrophages, l'activation des LT cytotoxiques et l'hypersensibilité retardée.

L'induction de phénotype Th1 est sous le contrôle de deux voies principales. La signalisation de l'IL-12 via son récepteur, active le STAT4 qui induit la transcription de l'INF- γ . L'INF- γ d'autre part active STAT1, qui augmente l'expression du T-bet (principal facteur de transcription de Th1) qui potentialise la production de l'INF- γ (Biedermann *et al.*, 2004 ; Oestreich *et al.*, 2012) (Fig.13). Ces deux voies se régulent par des mécanismes de rétroaction positive.

❖ Lymphocytes Th2

Les Th0 sous l'influence de IL-4 et IL-10 vont se différencier en Th2, qui va accentuer la sécrétion d'IL-4, IL-10 et IL-5, IL-13. Ce phénotype est à l'origine de l'activation des macrophages M2 et privilégie la prolifération et la différenciation des LB, d'où son rôle clé dans l'immunité humorale. Il est aussi impliqué dans la réaction d'hypersensibilité immédiate en favorisant la production d'IgE par la sécrétion d'IL-5, qui entraîne aussi la différenciation des éosinophiles, et joue donc un rôle dans la réponse immunitaire anti-helminthes.

L'induction de phénotype Th2 est également sous le contrôle de deux voies. Le complexe TCR-CD4 induit le facteur c-Maf qui à son tour induit la production de l'IL-4 qui se fixe sur son récepteur pour activer le STAT6 qui induit l'expression de GATA-3 à l'origine de l'expression de l'IL-5 et l'IL-13 (Fig. 13) (Christodoulouopoulos *et al.*, 2001 ; Biedermann *et al.*, 2004).

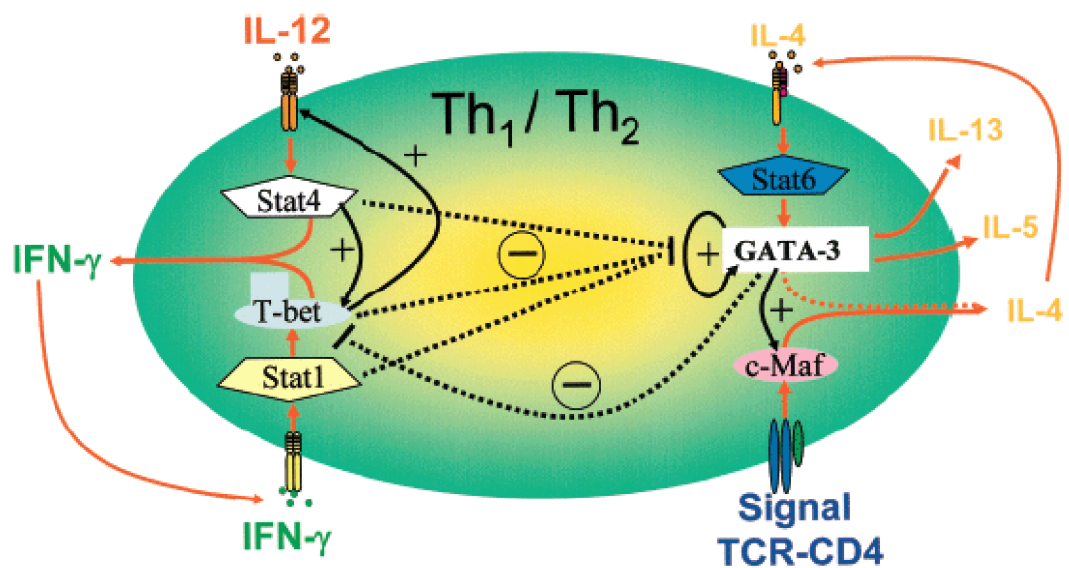


Figure N° 13: Voies d'induction conduisant aux phénotypes Th1 et Th2 (Biedermann *et al.*, 2004)

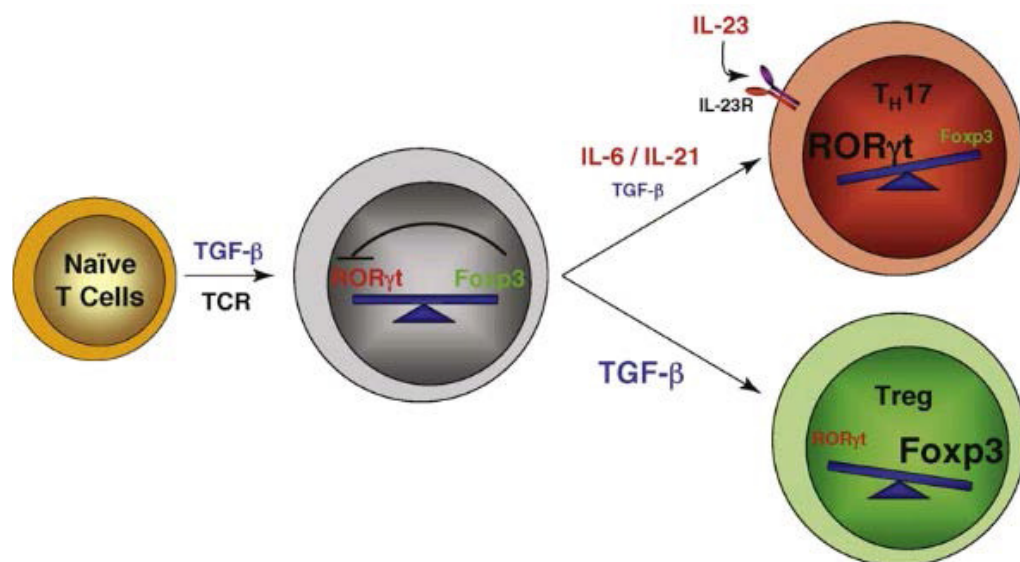


Figure N° 14 : Balance entre RORγt et Foxp3 aboutissant à la différenciation de Th17 ou Treg. (Zhou *et al.*, 2009).

❖ Lymphocytes Th17

Sous l'influence de IL-6, IL-21, IL-23 et TGF- β , les Th0 se différencient en Th17 (Zhou *et al.*, 2009) qui sécrètent l'IL-6, l'IL-17 et IL-22. Les Th17 peuvent donc être décrites comme des cellules pro-inflammatoires, impliquées dans de nombreuses maladies auto-immunes. Ils sont impliqués dans l'inflammation et ont un rôle important et parfois déterminant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice lors d'infections bactériennes et fongiques.

❖ Lymphocytes Treg

L'IL-10 et TGF- β induisent la différenciation de Th0 en Treg, qui perpétue la production de TGF- β . Ce phénotype est impliqué dans la régulation de la réponse immunitaire et d'auto-immunité. Les lymphocytes T régulateurs forment une sous population de lymphocytes T CD4, qui semble favoriser la tolérance immunitaire. Ils agissent en inhibant les lymphocytes T effecteurs. Ils sont subdivisés en deux groupes :

- Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs) ;
- Les lymphocytes T régulateurs induits.

In vitro, la différenciation vers Th17 ou Treg est dépendante de la concentration du TGF- β (Zhou *et al.*, 2009).

En présence de cytokines pro-inflammatoires et de faibles concentrations de TGF- β , l'expression du facteur ROR γ t est régulée à la hausse inhibant en même temps l'expression de Foxp3, basculant ainsi la balance en faveur de Th17. ROR γ t induit l'expression de l'IL-23R qui potentialise la différenciation Th17 suite à la fixation de son ligand IL-23 (Zhou *et al.*, 2009 ; Schmitt *et al.*, 2013) (Fig.14).

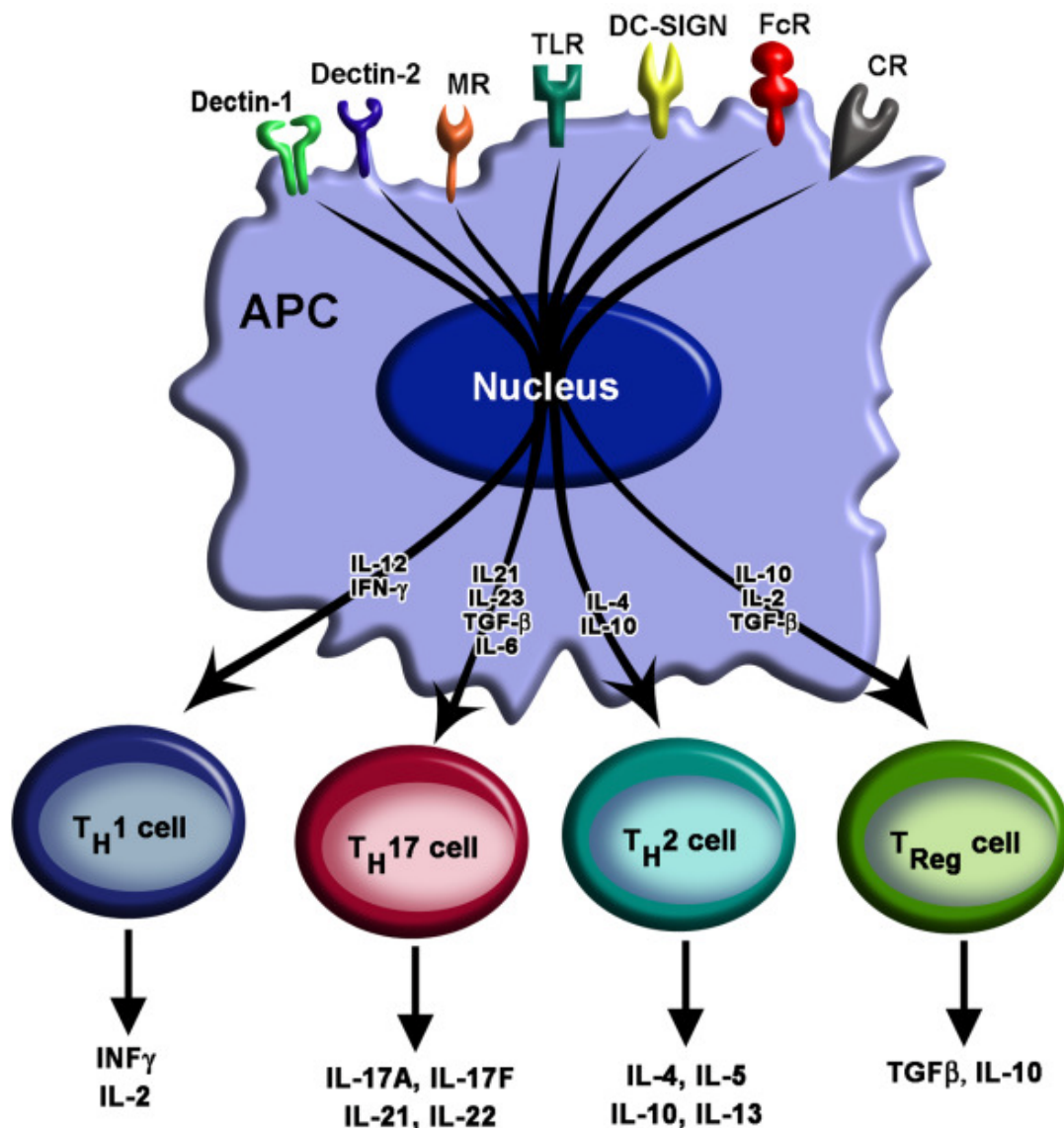


Figure N°15 : Polarisation des lymphocytes TCD4 (Kronek *et al.*, 2012)

APC-derived cytokines and TH cell polarization. Pattern-Recognition Receptors (PRR): Dectin-1, Dectin-2, mannose receptor (MR), Toll-like receptor, DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin), Fc receptor (FcR) - binding specificity for a Fc region of immunoglobulins, complement receptor (CR) - receptor of the complement system.

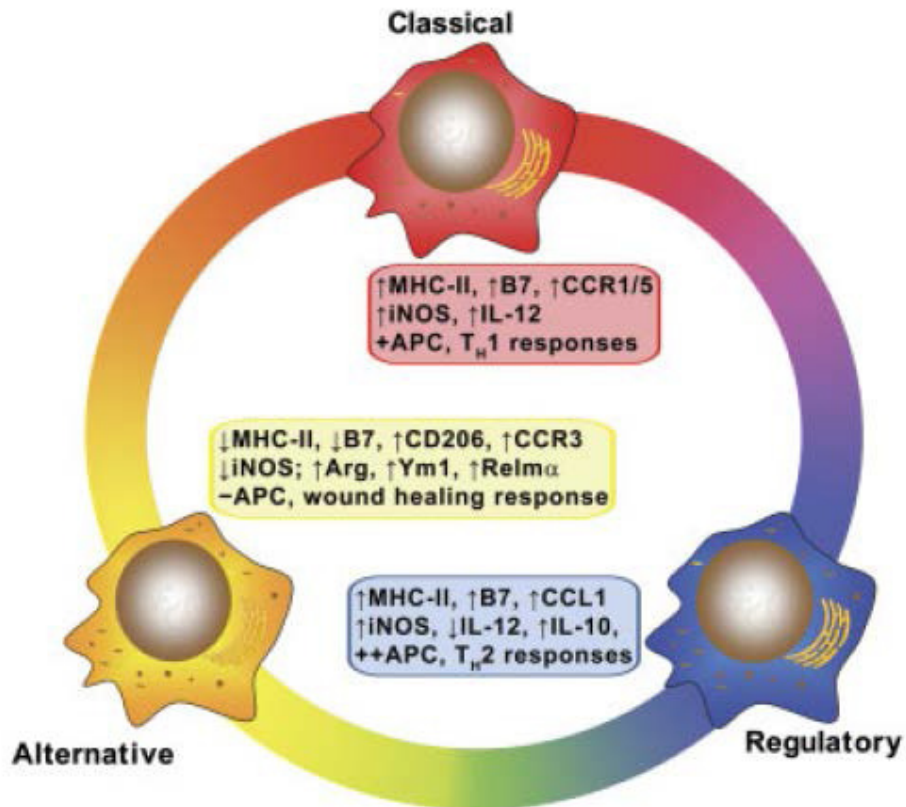


Figure N° 16 : Les trois grands phénotypes des macrophages (Mosser, 2008)

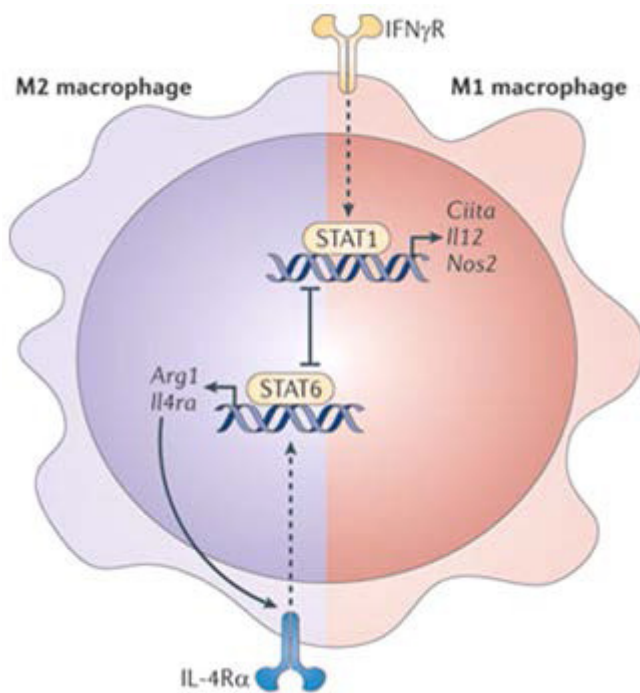


Figure N° 17: Voies de signalisation M1 et M2 (Coccia *et al.*, 2000).

1.2.1.3 La polarisation et les états d'activation des macrophages

Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné avec des rôles bien établis dans la réponse primaire aux agents pathogènes, mais aussi dans l'homéostasie tissulaire, la coordination de la réponse immunitaire adaptative, dans l'inflammation, la résolution et la réparation (Varin et Gordon, 2009). Ils constituent la première ligne de défense contre les agents pathogènes. Ils sont capables de répondre aux stimuli provenant d'autres cellules, peuvent organiser une réponse inflammatoire ou anti-inflammatoire et participer à l'orchestration de l'immunité adaptative (Mantovani *et al.*, 2007 ; Mosser *et al.*, 2008). Ils sont caractérisés par leur plasticité phénotypique et fonctionnelle en réponse à des signaux du microenvironnement (Galès, 2009).

Il y a une décennie, les macrophages étaient classés en deux phénotypes : les macrophages issus de l'activation classique, associée à l'activité pro-inflammatoire et les macrophages issus de l'activation alternative, associée à l'activité anti-inflammatoire (Goerdts *et al.*, 1999 ; Mc Grath *et al.*, 1999). Ensuite, le phénotype de macrophages issus de l'activation classique sont qualifiés de macrophages M1 et ceux d'activation alternative de macrophages M2 (Mantovani *et al.*, 2002 ; Gordon *et al.*, 2003).

Les macrophages M2 étaient généralement considérés plus hétérogène que les M1 et, pour tenir compte de ces différences, ils ont été subdivisés en M2a, M2b, et M2c (Mantovani *et al.*, 2004). Depuis quelques années, 3 phénotypes principaux basés sur 3 concepts semblent faire l'unanimité : le concept d'activation classique associée aux macrophages M1, activation alternative associée aux macrophages M2a et le concept d'activation de type II ou de macrophages régulateurs associés aux macrophages M2b (Mosser, 2008) (Fig. 17).

➤ Les macrophages M1 (activation classique)

L'activation des macrophages par la voie classique conduisant aux macrophages M1, nécessite une exposition à une série de stimuli en relation avec les Th1 à savoir l'IFN- γ et parfois TNF- α ou IL-1 et avec le LPS et d'autres motifs microbiens, qui lient les récepteurs

Toll-like. Cet état d'activation va engendrer un environnement pro-inflammatoire et la destruction (activité microbicide élevée) des agents pathogènes par la sécrétion des cytokines telles que TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-8 et l'induction de iNOS, enzyme catabolisant l'arginine en monoxyde d'azote (NO) radical libre toxique pour de nombreux agents pathogènes. En

plus de NO, le M1 est capable de produire des dérivés oxygénés toxiques. La voie de signalisation des macrophages M1 met en jeu principalement les récepteurs de l'IFN- γ et le

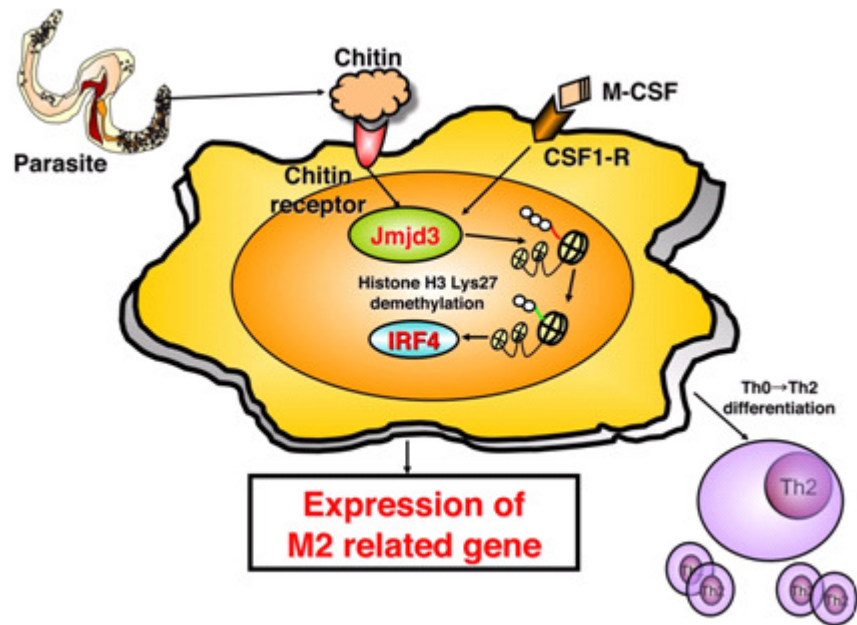
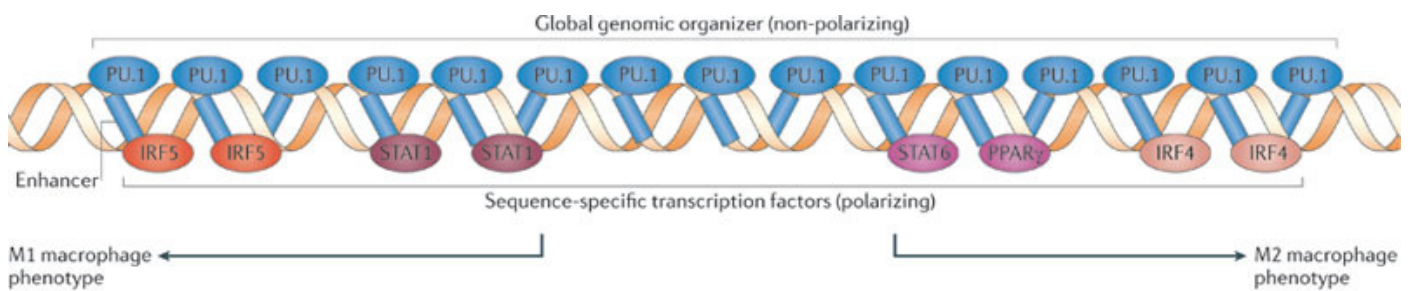


Figure N° 18 : Voie d'induction de M2 induite par les helminthes (Satoh *et al.*, 2010)



Nature Reviews | Immunology

Figure N° 19: Illustration des rôles de facteurs de transcription dans la polarisation des macrophages (Lawrence et Natoli, 2011)

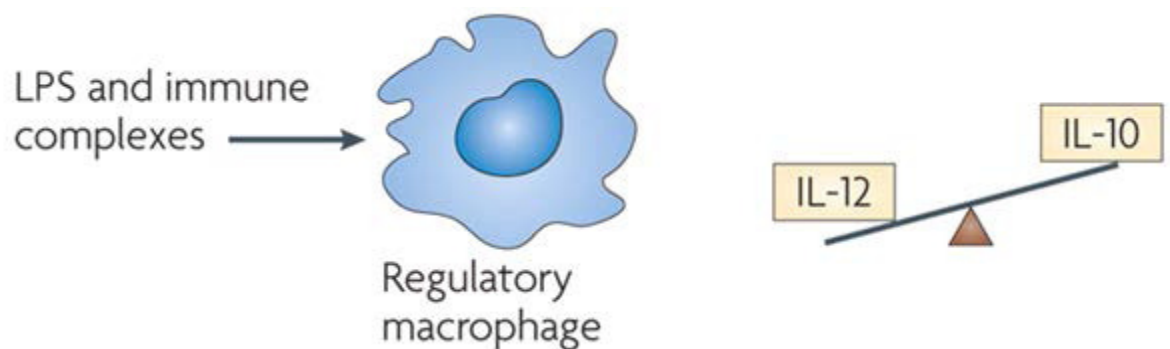


Figure N° 20 : Esquisse de l'activation des macrophages régulateurs (Mosser *et al.*, 2008)

facteur STAT1 via JAKs qui active les promoteurs des gènes liés à ce phénotype (Coccia *et al.*, 2000) (Fig. 17).

Macrophages M2a (activation alternative)

Ils sont induits par les cytokines IL-4 et IL-13. Cette activation est à l'origine d'une activité anti-inflammatoire. Les M2a expriment l'arginase, enzyme catabolisant l'arginine en urée plus ornithine, précurseur des polyamines nécessaires pour la réparation de tissus. En plus de l'arginase, les macrophages M2a sont marqués par une surexpression du récepteur mannose, de la production d'IL-1ra. Par ailleurs, l'arginase et l'iNOS sont en compétition pour le même substrat, l'arginine. Les M2a présentent une activité anti-inflammatoire, de remodelage de tissus et de régulation de Th2. Les voies de signalisation de M2a sont dépendantes du récepteur de l'IL-4 qui active le STAT6, à l'origine de l'activation des promoteurs des marqueurs de M2a. Les facteurs STAT1 et STAT6 ont des effets antagonistes (Coccia *et al.*, 2000) (Fig. 17).

La chitine des helminthes se fixe sur son récepteur macrophagique pour activer le mjd3 qui se déméthyle pour activer l'IRF4 à l'origine de la transcription de nombreux gènes associés au M2 (Sato *et al.*, 2010). Ce mécanisme est impliqué dans la réponse anti-helminthes (Fig. 18).

Les facteurs STAT6, IRF4, PPAR γ sont impliqués dans l'expression des gènes liés aux macrophages M2, tandis que STAT1, IRF5 sont associés aux macrophages M1. En revanche, le facteur de transcription PU.1 contrôle le répertoire activateur spécifique des macrophages indépendamment de la polarisation (Lawrence et Natoli, 2011) (Fig. 19).

➤ Les macrophages M2b (Macrophages régulateurs)

Ils sont induits par les complexes immuns en synergie avec les ligands de TLRs (Mosser *et al.*, 2008 ; Sica *et al.*, 2012 ; Clark 2012). Cette activation va induire la production de IL-10 et des faibles niveaux de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL -12 (Mosser *et al.*, 2008) et exprime aussi de iNOS selon certains auteurs (Mosser *et al.*, 2008 ; Ferrante *et al.*, 2013) (Fig. 20). L'activation des macrophages avec un seul stimulus, agoniste de TLR, entraîne la production d'un grand nombre de cytokines inflammatoires, mais cette stimulation ne semble être pas suffisante pour produire un taux élevé d'IL-10. Le second stimulus permet d'induire la production de cette cytokine (Fleming *et al.*, 2011). La production de l'IL-10 au niveau des

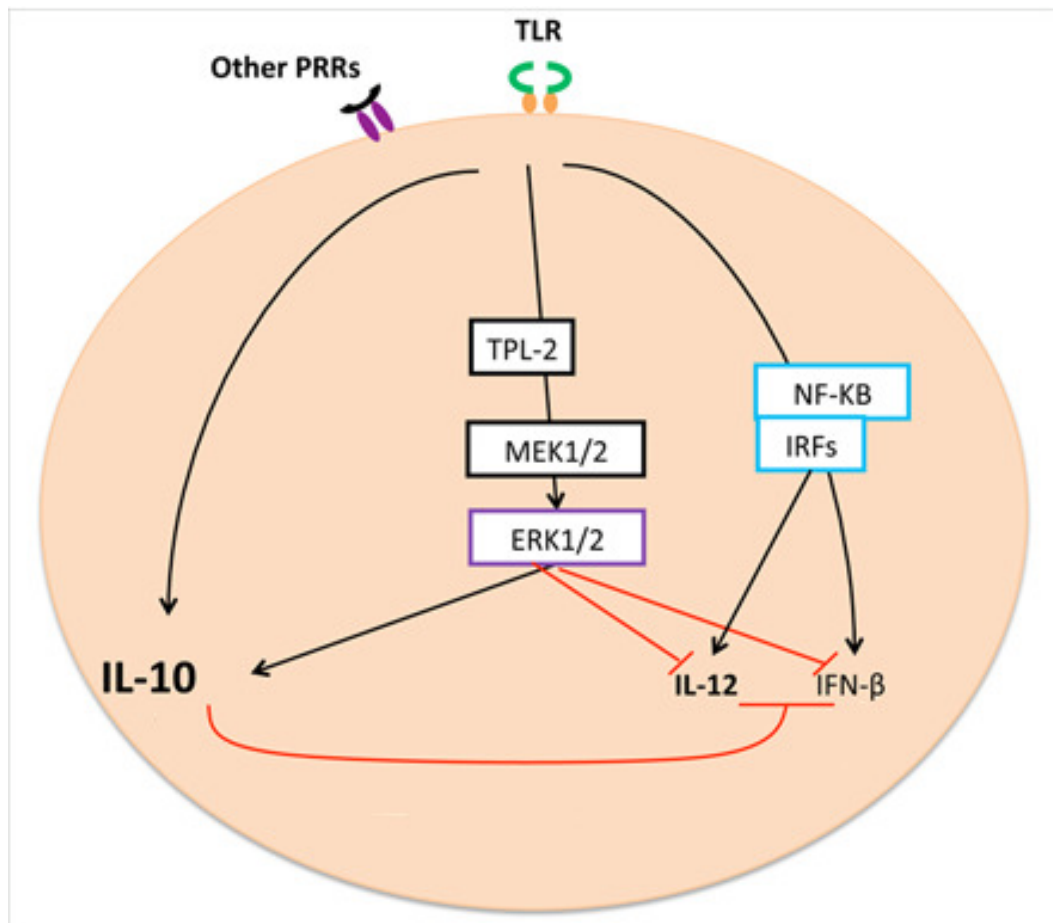


Figure N° 21 : Voie de signalisation aboutissant à la production de l'IL-10

<http://www.nimr.mrc.ac.uk/phd/projects/molecular-mechanisms-for-the-regulation-of-il-10-production-in-macrophages-> (Oct. 2013)

macrophages régulateurs suit la voie de signalisation de ERK via TPL-2 et phosphoryle les histones associés au promoteur de l'IL-10, ce qui rend le promoteur plus accessible pour les facteurs de transcription qui induisent l'expression du gène de l'IL-10 (Lucas *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006) (Fig. 21).

D'autres stimuli et voies de signalisation sont mises en évidence dans l'induction de ce phénotype. La double activation TLR et PGE2R phosphoryle le facteur de transcription CREB, co-activé par le facteur CRTC3 pour induire l'expression de l'IL-10 (Clark *et al.*, 2012 ; MacKenzie *et al.*, 2013).

➤ **Autres types de phénotypes macrophagiques**

En plus de ces trois principaux phénotypes, d'autres phénotypes ont été décrits, dont certains apparaissent comme intermédiaires ou assimilés aux trois précités. Il existerait probablement un continuum entre les différents phénotypes d'activation des macrophages

Macrophages M2c

Ils sont induits par l'IL-10 et permettent la production de TGF- β , IL-1ra et augmentent l'expression du récepteur mannose. Ils ont une fonction d'immunorégulation, de déposition de matrice, et de remodelage tissulaire. Certains auteurs qualifient M2c de « phénotype IL-10 activé » (Mantovani *et al.*, 2004 ; Wilson *et al.*, 2005).

Macrophages associés aux tumeurs (TAMs : Tumor Associated Macrophages)

Cette activation est induite par des cellules malignes/tumorales, les phénotypes de cette activation produisent l'IL-10, le TGF- β , l'IL-4 et la PDE2. Ils ont pour fonction le développement de la tumeur, des métastases et de l'angiogenèse. Mantovani *et al* en 2002 ont démontré que les TAMs sont une sous population des macrophages M2, ce qui est confirmé par plusieurs autres auteurs en raison de leur propriété et de leur fonction.

Macrophages ATM

Les phénotypes ATM (Adipose tissue Macrophages) sont des monocytes qui s'infiltrant et se différencient dans le tissu adipeux lors de l'obésité. Les ATM de souris expriment beaucoup de gènes caractéristiques de macrophages M2 qui peuvent protéger les adipocytes de l'inflammation (Weisberg *et al.*, 2003).

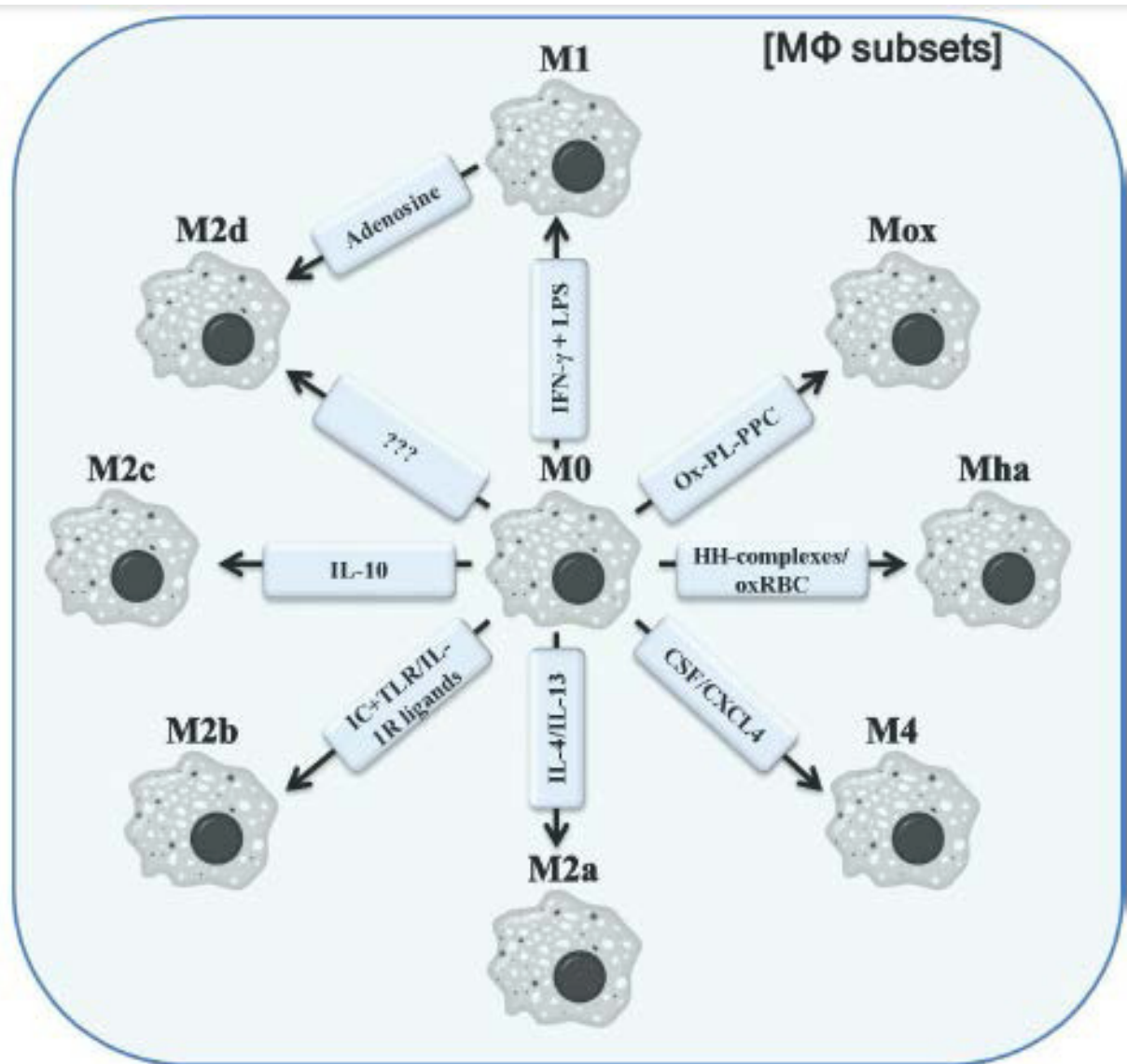


Figure N°22 : Différentes sous populations des Macrophages polarisés. (Hristodorov *et al.*, 2012)

Abréviations: IC, complexe immunitaire; TLR, Toll-like receptor; IL-1R, IL-1 receptor; Ox-PL-PPC, ox-PL 1-palmitoyl 2-arachidonoylsn-glycéro-3-phosphorylcholine; HH-complexes, Hapto de l'hémoglobine; oxRBC, les globules rouges oxydés; CSF, le facteur de stimulation des colonies; CXCL4, une chimiokine (CXC motif) ligand 4.

Macrophages activés par fixation des cellules apoptotiques + LPS

Ils sont induits par les cellules apoptotiques plus LPS et produisent du TGF- β , PGE2 et ont une fonction anti-inflammatoire et immunosuppressive.

Macrophages M2d

Les macrophages M2d résultent de la re-polarisation de M1 par la signalisation d'adénosine. Il n'y a pas encore d'information sur un stimulus initial polarisant M0 à M2d. Par contre, il a été rapporté que les M2d seraient des TAMs (Duluc *et al.*, 2009 ; Wang *et al.*, 2010).

Macrophages Mox

Ils représentent 30% des macrophages présents dans la lésion artérioscléreuse (Kadl *et al.*, 2010). Ils sont induits par ox-PL 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine (Ox-PL-PPC) (Fig. 22), phospholipide oxydé, et caractérisés par une haute expression élevée des gènes de l'hème oxygénase 1 (HO-1), de sulforedoxin-1 (Srx-1) et de la thiorédoxine-1-réductase (tXNRD-1), gènes redox de régulation sous contrôle du facteur de transcription Nrf2 (Kadl *et al.*, 2010). En outre, les Mox peuvent être induits à partir d'un phénotype M1 ou M2, en fonction de la présence du phospholipide oxydé dans l'environnement (Shalhoub *et al.*, 2011).

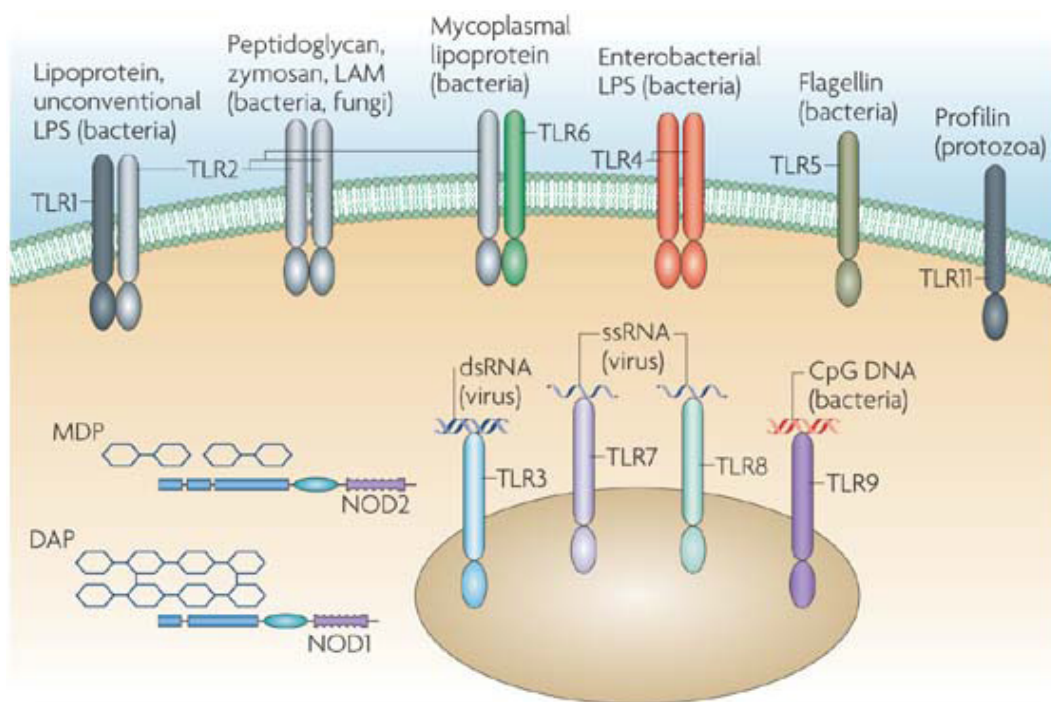
Les Mox sont dotés d'une activité antioxydante (Shalhoub *et al.*, 2011). Des travaux sur l'implication de l'HO-1 dans les pathologies infectieuses ont débuté. Les EHEC (Enterohémorragic *Escherichia coli*), en activant l'HO-1, modulent et inhibent l'expression et l'activité de la iNOS par répression du facteur de transcription STAT1 (Vareille *et al.*, 2008).

Macrophages Mha

Des macrophages associés à l'hémorragie ont été décrits depuis quelques années. Ce phénotype est induit à partir de M0 stimulé par le complexe haptoglobine-hémoglobine. Ils expriment le récepteur CD163, HO-1 et IL-10 d'une manière Nrf2-dépendante. Certains auteurs pensent que les Mox seraient étroitement liés aux Mha (Hristodorov *et al.*, 2012).

Macrophages M4

Des macrophages CSF/CXCL4 dépendants nommés M4 (Fig. 22) présentent simultanément des caractéristiques des profils M1 et M2 avec transcriptions et expression de CD86 et TNF- α (liés au M1), CD206, CCL18 et CCL20 (liés au M2), un niveau faible d'IL-10. Ils ont une faible activité phagocytaire, leurs fonctions restent inconnues (Gleissner, 2010).



Nature Reviews | Microbiology

Figure N° 23 : Les Toll-like et NOD-like Receptors (Kaufmann *et al.*, 2007)

1.2.1.4 Les grands groupes des récepteurs de l'immunité innée

Le système immunitaire reconnaît les microorganismes grâce à des immunorécepteurs pour certains motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs), signatures spécifiques d'un groupe d'agents infectieux. La défense contre ces agents est basée sur la capacité du système immunitaire à reconnaître ces motifs structuraux conservés. Ces motifs influent également sur la polarisation des macrophages (Galès *et al.*, 2009). L'interaction macrophage pathogène est associée à l'expression d'un panel spécifique de récepteurs membranaires qui conditionnent leurs capacités à reconnaître ces agents infectieux. Cette reconnaissance entraîne l'activation des fonctions effectrices des macrophages.

Les PRRs (Pattern recognition receptors)

Les PRRs exprimés par les cellules immunitaires sont indispensables pour détecter ces agents et initier les réponses immunitaires innée et adaptative. Il existe plusieurs familles de PRRs qui sont, entre autres : les récepteurs Toll-like associés à la membrane (TLR), des récepteurs lectine de type C (PLC), les récepteurs NOD-like cytosolique (NLR), les récepteurs de RIG-I-like (SRRL) et les récepteurs AIM2-like (ALR).

➤ Les Toll-like et NOD-like Receptors

Les TLR initient la réponse immunitaire à la suite de reconnaissance des PAMP présents dans les molécules des agents pathogènes ou de signaux de danger endogènes libérés par les cellules endommagées (DAMPs). Il y a dix TLR fonctionnels chez les humains, douze chez les souris (Kawai et Akira, 2011). Parmi les TLR humains, TLR1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont exprimés à la surface de la cellule et reconnaissent principalement la membrane microbienne et des composants de la paroi cellulaire, tandis que TLR3, 7, 8 et 9 sont dans les membranes des compartiments et reconnaissent des acides nucléiques (Blasius et Beutler, 2010) (Fig. 23). L'activation des TLR induit les voies de signalisation aboutissant à l'expression des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, et des interférons. Les Domaines d'Oligomérisation de fixation des Nucléotides (NOD)-like receptors (NLR) sont des récepteurs cytosoliques qui reconnaissent également des PAMPs présents dans le cytosol. Les récepteurs Toll-like (TLR) sont exprimés par un certain nombre de types de cellules du système immunitaire et non immunitaire qui sont : les monocytes, macrophages, cellules dendritiques, des neutrophiles, des lymphocytes B et T, les fibroblastes, les cellules endothéliales et épithéliales (Iwasaki et Medzhitov, 2004).

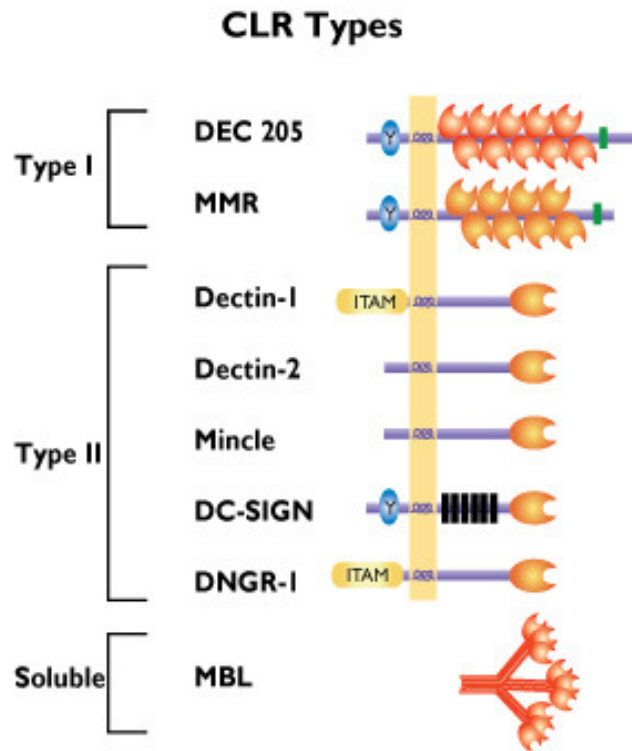


Figure N° 24 : Les récepteurs lectines de type C (<http://www.invivogen.com/review-clr>) (juillet 2013)

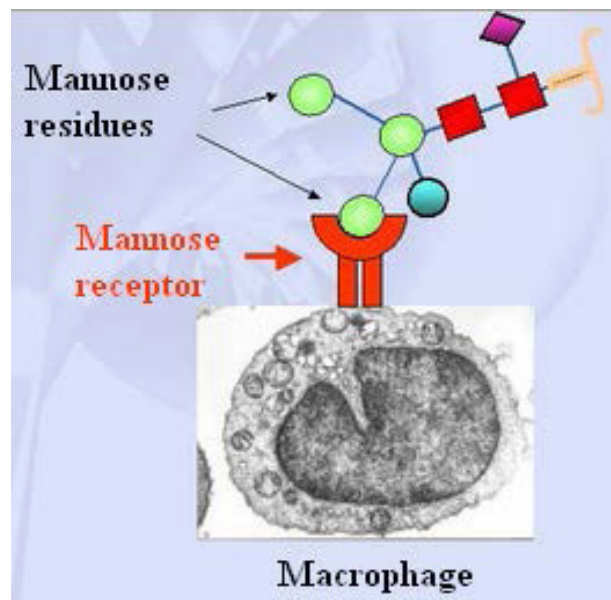


Figure N° 25 : Récepteur mannose macrophagique (Aviezer, 2007)

<http://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1006281/000095013607007421/file3.htm> (Juin 2013)

➤ La famille des lectines de type C

Les lectines du type C sont des lectines membranaires caractérisées par un domaine de reconnaissance des carbohydrates (CRD) «carbohydrate recognition domain» (Fig. 24). Ce sont des molécules se fixant sur la partie carbohydrate des glycoprotéines qui jouent un rôle d'ancrage des divers agents pathogènes. Le CRD interagit avec des glycoprotéines ou glycolipides (avec des motifs comportant un mannose, un galactose, fucose, glucane) des agents pathogènes de manière calcium dépendante (d'où l'appellation du « type C »). Ces récepteurs favorisent la phagocytose et sont portés principalement par les macrophages et les cellules dendritiques. Ils régulent également la signalisation, et permettent aussi l'adhésion et la migration cellulaire. Il existe plusieurs sous-classes du récepteur lectine type C dont les plus représentatifs sont : le récepteur mannose, le récepteur au β -glucane (Dectine), le DC-SIGN chez l'homme et le SIGNR1 chez la souris.

➤ Récepteurs au mannose (CD 206)

Le récepteur mannose est exprimé par les monocytes, les macrophages (Fig. 25), les cellules dendritiques, et d'autres tissus, comme le tissu hépatique (Mckenzie *et al.*, 2007 ; Taylor *et al.*, 2005). Le récepteur mannose macrophagique (MMR) est un récepteur lectine type C de type I, transmembranaire contenant plusieurs CRD ou domaines CRD-like encore appelés CTLD (C-type Lectin-Like Domaines). Ces régions en boucle polypeptides permettent la fixation des ligands carbohydrates, des glyco-conjugués liés au pathogènes ou des glycoprotéines exogènes et endogènes sécrétées. Son affinité est plus élevée pour un motif associé au mannose et fucose et moyen ou faible pour N-acétylgucosamine, galactose etc. Le MMR favorise la phagocytose. Il a été rapporté que l'inhibition du MMR diminue significativement la phagocytose de *Enterococcus faecalis* (Tsuruta *et al.*, 2013). Dans la cryptococcose murine à *Cryptococcus neoformans*, les souris KO pour Mrc1 meurent plus rapidement que les souris WT (Dan *et al.*, 2008).

Le MMR fortement exprimé sur les macrophages alvéolaires, fonctionne comme un récepteur scavenger pour dégager des particules étrangères et en même temps réguler les réponses inflammatoires dangereuses. Ainsi, *Mycobacterium tuberculosis* expose à la surface de son enveloppe le lipoarabinomannane, dont la coiffe mannosylée se fixe sur le récepteur mannose. Cette fixation entraîne l'endocytose et la formation d'un compartiment vésiculaire dans lequel la bactérie survit et se développe (Torrelles *et al.*, 2010).

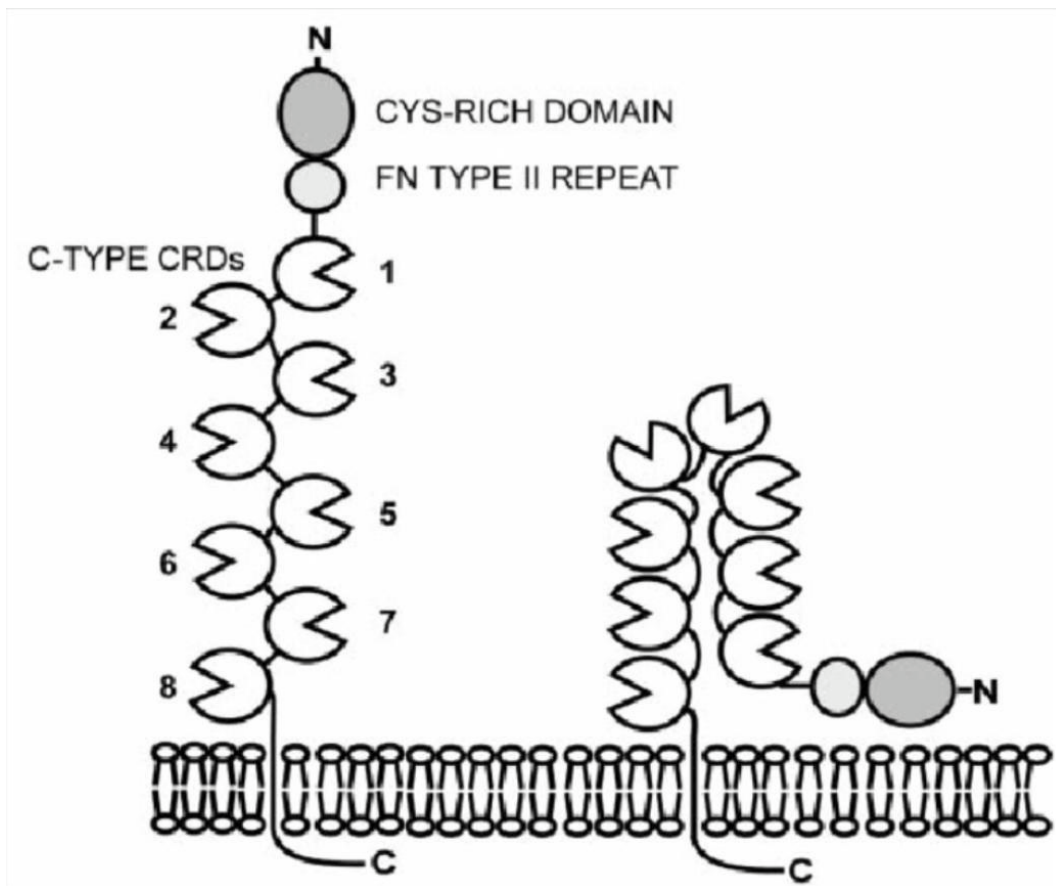


Figure N° 26 : Structure du récepteur mannose (Napper *et al.*, 2001)

Le MMR est constitué de 3 parties : 8 CRD présentant des sites de fixation aux carbohydrates, une répétition de la fibronectine de type II et un domaine riche en cystéine N-terminale capable de fixer les carbohydrates sulfatés (Fig. 26). Les résidus N-acétylgalactosamine sulfate ont une affinité élevée pour la forme soluble du MMR (comprenant l'ensemble du domaine extracellulaire) par rapport au mannose alors que le fait inverse est montré pour la forme tronquée du MMR (contenant les huit CRD mais dépourvu du domaine riche en cystéine N-terminale et la répétition fibronectine de type II) (Simpson *et al.*, 1999). Cette affinité dépend aussi du pH et de la force ionique. Les lectines de type C sont classés en deux groupes par rapport à leur spécificité aux différents sucres (Lee *et al.*, 2011). Le premier groupe dont leurs CRD contiennent le motif tripeptidique Glu-Pro-Asn, (récepteur du mannose des macrophages (MMR) et mannose binding protéine (MBP) présente une affinité plus élevée pour le mannose, N-acétyl-glucose, glucose et L-fucose, (Lee *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 2011 ; Engering *et al.*, 1997a ; Engering *et al.*, 1997b).

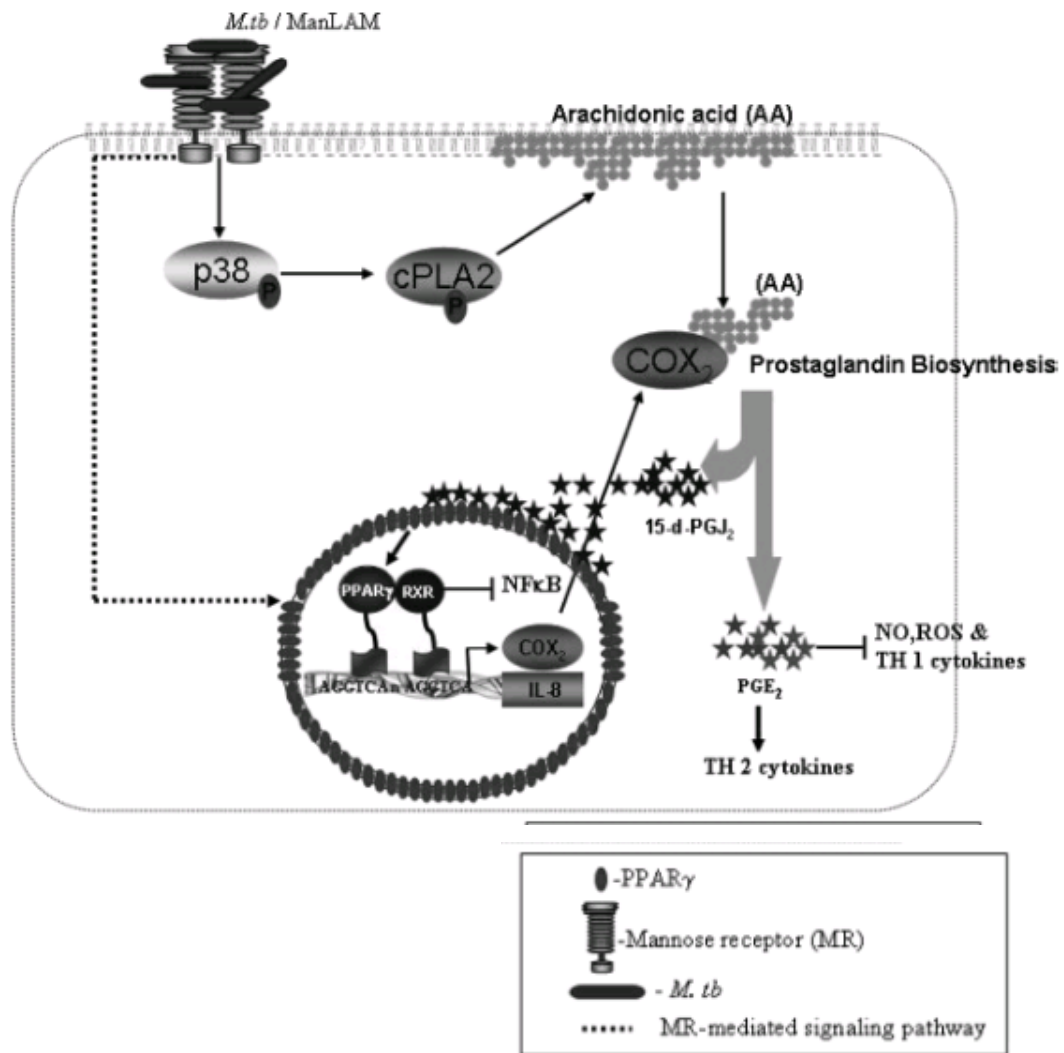


Figure N°27 : Voie de signalisation du récepteur mannose activée par une glycoprotéine de *M. tuberculosis* (Rajaram *et al.*, 2010)

tandis que ceux dont les CRD contiennent le motif (Glu-Pro-Asp) se lient au Galactose et au N-acétyl galactosamine (Drickamer *et al.*, 1992). L'affinité pour le MMR soluble varie de la manière suivante : D-Mannose = L-Fucose > au D-Galactose (Martínez-Pomares *et al.*, 1998). La semi-rigidité, la flexibilité et le changement de conformation du MMR modifient sa position et de ce fait augmentent les possibilités de fixations (Napper *et al.*, 2001).

Dans la tuberculose, l'activation du MMR déclenche une série de signalisations dont la phosphorylation de MAPK-p38, aboutissant à l'activation du PPAR γ membre de la superfamille du récepteur nucléaire impliqué dans l'expression de nombreux gènes du profil anti-inflammatoire et dans l'inhibition du NF κ B à l'origine de la production des cytokines pro-inflammatoires (Rajaram *et al.*, 2010) (Fig. 27).

➤ **Récepteur au B –glucane (Dectin)**

La Dectine a une affinité pour le D-glucane, polymère de glucose, composant majeur de la paroi de la plupart des champignons et de certaines bactéries. La Dectine est une lectine de type C exprimée principalement par les cellules myéloïdes, macrophages cellules dendritiques. Il présente un domaine CDR. Il existe deux types : dectine-1 et dectine-2. La différence fondamentale est liée à la transduction du signal de dectin-1 via ITAM, alors que la dectine-2 ne porte pas de motif ITAM. En plus, l'activation de la dectine-1 est associée à celle de TLR-2. L'interaction ligand-récepteur conduit à la phagocytose des pathogènes et à l'activation d'une cascade de signalisations intracellulaires, aboutissant à la production des cytokines pro-inflammatoires et des chémokines.

➤ **DC-SIGN (CD 209)**

DC-SIGN, une lectine de type C, localisée à la surface des cellules dendritiques et des macrophages. Il joue un rôle déterminant dans plusieurs processus physiologique, en particulier dans la migration et l'adhésion des DCs par sa liaison avec les ICAM2 présents sur l'endothélium. Sa liaison avec ICAM3 porté par les LT permet la formation de la synapse immunologique. Le DC-SIGN est utilisé par une série d'agents pathogènes (VIH, VHC, virus de la dengue, Ebola, *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* et certains parasites) pour contourner le système immunitaire (Lozach *et al.*, 2004).

➤ **SIGNR1 (CD 209 b)**

Le SIGNR1, protéine transmembranaire homologue de DC-SIGN humain, est présent sur les macrophages des souris et des rats. Il est impliqué dans la réponse inflammatoire.

1.2.2 Immunopathologie et relations hôtes parasites dans la THA

1.2.2.1 Réponse de l'organisme

L'inoculation de trypanosomes chez les mammifères déclenche une série d'événements entraînant la réponse immunitaire de l'hôte. Celle-ci inclut les phénomènes d'immunité naturelle puis, secondairement, ceux de l'immunité adaptative. De nombreuses modifications du système immunitaire ont été observées dans la THA : une hypergammaglobulinémie majeure constituée principalement d'immunoglobulines non spécifiques, la présence de nombreux auto-anticorps, une immunodépression marquée, une inefficacité des vaccinations, une dérégulation majeure du réseau des cytokines, avec une augmentation considérable et persistante du TNF- α et de l'IL-10 (Vincendeau et Bouteille, 2006).

Le premier événement, quelques jours après l'inoculation, est la formation du chancre d'inoculation qui représente la première réponse locale correspondant à la première protection développée par l'hôte. Les cellules et les molécules inflammatoires s'infiltrant dans le foyer d'inoculation. Cependant, les trypanosomes prolifèrent et gagnent le système lymphatique, se multiplient activement et sont ensuite libérés dans le sang circulant. Les Lymphocytes T activés, prolifèrent et libèrent l'IFN- γ , molécule ayant de nombreux rôles au sein de la réponse immunitaire, mais qui stimulerait aussi la prolifération du trypanosome. Le TLTF se lie à la molécule CD8, la parasitémie des souris CD8^{-/-} est réduite par rapport aux souris WT, et leur durée de survie est doublée (Olsson *et al.*, 1993). Les macrophages activés éliminent les parasites par la sécrétion des molécules cytotoxiques et/ou cytostatiques, dont le TNF- α et le NO (Vincendeau *et al.*, 1992).

Une très forte augmentation des IgM et des IgG, spécifiques et surtout non spécifiques, est mesurée dans le sérum des patients atteints de THA (Greenwood *et al.*, 1973). Les anticorps spécifiques forment des complexes immuns en se liant aux antigènes du parasite. Dans la THA, il est observé une prolifération polyclonale des LB et, paradoxalement, une immunodéficience progressive (Sacco *et al.*, 1994). La reconnaissance par les lymphocytes B de motifs CpG non méthylés de l'ADN des trypanosomes provoque une prolifération polyclonale non spécifique de ces cellules (Shoda *et al.*, 2001). Le rôle des LB dans l'immunosuppression, par rapport à ceux des LT supresseurs et des macrophages n'est pas connu. Les vaccinations des bovins trypanosomés sont inefficaces (Ilemobade *et al.*, 1982).

La trypanosomose a été l'une des premières maladies dans lesquelles l'implication du TNF- α a été observée (Cerami *et al.*, 1988). Il est trypanolytique pour *T. b. brucei in vitro* et réduit la charge parasitaire *in vivo* (Lucas *et al.*, 1994 ; Magez *et al.*, 1997). La VSG induit une forte synthèse de TNF- α , qui est l'une des caractéristiques physiopathologiques majeures de la THA (Daulouède *et al.*, 2001). En plus de son effet trypanocide, le TNF- α participerait aussi à la modification de la barrière hémato-encéphalique, permettant le passage des trypanosomes dans le système nerveux central (Girard *et al.*, 2005 ; Amin *et al.*, 2012).

Une corrélation a été faite entre le taux du TNF- α sérique et la sévérité de la maladie (Okomo *et al.*, 1995). Le TNF- α , autrefois également appelé cachectine, serait à l'origine de la cachexie sommeilleuse qui est la phase terminale de la THA, et partiellement responsable de l'immunosuppression sévère observée dans la trypanosomose (Magez *et al.*, 1999). Des auto-anticorps dirigés contre des cibles variées sont sécrétés dans la THA.

1.2.2.2 Mécanismes d'échappement élaboré par le parasite

Au cours de la co-évolution avec leurs hôtes, les trypanosomes ont mis en place une série de mécanismes et de stratégies de survie, assez remarquables, leur permettant d'échapper au contrôle, ou d'altérer le système immunitaire de l'hôte et de le moduler. Beaucoup de ces mécanismes sont encore inconnus. Parmi les mécanismes connus, il faut souligner :

- L'inhibition du facteur sérique trypanocide,
- Le recouvrement du parasite par un manteau riche en glycoprotéine variable (VSG), entraînant le phénomène de variation antigénique ;
- L'inhibition de la lyse médiée par le complément ;
- L'inhibition de la réponse inflammatoire ;
- Dérégulation du réseau des cytokines ;
- L'inhibition de la réponse LT ;
- Activation de LTCD8 par TLTF ;
- L'activation polyclonale de LB non spécifique ;
- L'expression de récepteurs membranaires pour la région Fc des Ig.

➤ La résistance au sérum humain

Les espèces *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont pathogènes pour l'homme tandis que *T. b. brucei* ne l'est pas. L'homme mis en contact avec *T. b. brucei* ne développera pas la maladie grâce à la présence dans le sérum humain d'un élément de la réponse innée, un

facteur de lyse pour le trypanosome (Raper *et al.*, 2001), le TLF (Trypanosome Lytic Factor)-1, présent dans le sérum et contenant l'apolipoprotéine A-1 (ApoL-1), et l'haptoglobin-related protéine (HPR). Le complexe ApoL-1/HPR est absorbé à l'intérieur du parasite, l'ApoL-1 se détache des particules d'HDL, s'insère dans la membrane lysosomiale et génère des pores ioniques (grâce à son domaine N-terminal) permettant le passage des ions chlorure du cytoplasme vers la lumière du lysosome et de la vacuole (Vanhamme *et al.*, 2003, Molina-Portela *et al.*, 2008 ; Perez-Morga *et al.*, 2005). Le flux ionique, associé à un passage d'eau, provoque un gonflement osmotique incontrôlable de la vacuole digestive entraînant la lyse du trypanosome chez l'homme (Vanhamme *et al.*, 2003). Des études ont montré que seule ApoL-1 est cytotoxique pour *T. b. brucei* et que l'HPR permet l'entrée rapide et efficace de ApoL-1 dans le parasite (Vanhamme *et al.*, 2003; Pays *et al.*, 2006; Shiflett *et al.*, 2007).

Cependant, *T. b. gambiense* et *T. b. rhodesiense* sont résistants au facteur TLF du sérum humain par le développement des mécanismes d'échappement et de résistance. Dans la trypanosomose à *T. b. rhodesiense*, cette activité trypanolytique est supprimée par la protéine associée à la résistance spécifique (SRA) (Radwanska *et al.*, 2002 ; Enyaru *et al.*, 2006). Le mécanisme de résistance à l'activité lytique et trypanocide de l'ApoL-1 est mise en évidence et se caractérise par la formation du complexe SRA / TLF-1 empêchant la pénétration du TLF-1 dans le parasite. Dans l'infection à *T. b. gambiense*, le parasite exprime une glycoprotéine spécifique (*TbsGP*) qui est à l'origine d'un mécanisme de défense multifactorielle. Elle réduit considérablement la pénétration de l'ApoL1 dans le parasite, empêche l'insertion de l'ApoL1 dans la membrane lysosomale et induit la rigidification de la membrane (Uzureau *et al.*, 2013).

Par ailleurs, des espèces de trypanosomes pathogènes des animaux, *T. evansi* à l'origine de la maladie chez les camélidés et le bétail, et *T. lewisi* parasite naturel du rat, sont parfois responsables de symptomatologie grave. En 2004, le premier cas de trypanosomose à *T. evansi* a été formellement identifié en Inde, chez un fermier de l'état central de Maharashtra (Truc *et al.*, 2007). Ses travaux révèlent que cette infection est due à l'absence, dans le sérum du patient, de l'ApoL-1. *T. evansi* se présente comme étant l'une des espèces de trypanosome la plus répandue notamment, en Amérique du Sud, en Afrique du Nord et dans une grande partie de l'Asie, dont l'Inde. De nombreuses populations humaines vivent actuellement au contact d'animaux infectés. Une infection par *T. lewisi* a été rapportée chez un nourrisson de 45 jours en Inde (Sarataphan *et al.*, 2007) et 7 cas antérieurs ont été également signalés (Uzureau *et al.*, 2013).

➤ Mécanisme d'échappement par la VSG

Chez les trypanosomes, le mécanisme de variation antigénique consiste à renouveler périodiquement sa surface constituée d'une protéine très immunogène, VSG. Cette protéine, fortement exprimée, est ancrée à la membrane afin de former une barrière dense, une sorte de "manteau protecteur". Les trypanosomes se couvrent de ce manteau pour se protéger de la réponse immunitaire de l'hôte. Le remplacement périodique de ce manteau par différents mécanismes génétiques constitue la variation antigénique. Ainsi, une modification de quelques acides aminés dans la séquence primaire de la VSG entraîne une VSG immunologiquement différente (Donelson *et al.*, 1998). Le génome du trypanosome possède environ 1000 gènes de VSG, chacun codent une protéine avec des propriétés antigéniques distinctes. Un gène VSG est exprimé à la fois et peut changer, suite à un ré-arrangement génétique qui permet l'expression d'une nouvelle protéine. Ainsi, en utilisant un réarrangement génique pour remplacer la protéine VSG initiale les trypanosomes ont toujours une longueur d'avance sur le système immunitaire.

Les mécanismes qui régulent l'expression des gènes d'antigènes de surface (VSG) du parasite sont étudiés depuis longtemps, mais beaucoup restent incompris. Ce processus implique la transcription d'un seul gène de VSG parmi un grand nombre présent dans le génome.

En effet, le séquençage récent du génome de *T. b. brucei* a mis en évidence la présence de 1700 gènes ou pseudogènes de VSG (Berriman *et al.*, 2005). Ces gènes sont localisés essentiellement en position télomérique ou subtelomérique (Horn *et al.*, 2005). Pour être transcrits, les gènes de VSG doivent être localisés dans un site télomérique appelé ES (expression site ou unités polycistroniques). Les gènes de VSG situés hors d'un site d'expression sont silencieux et dépourvus de promoteurs. Pour faire évoluer le répertoire de VSG afin que le parasite puisse renouveler constamment ses antigènes de surface, des processus permettant l'intégration d'un gène silencieux au niveau du site d'expression augmentant ainsi la diversification infinie du VSG.

La variation antigénique chez les trypanosomes est une variation antigénique programmée, régie par :

- Des recombinaisons réciproques ;
- Des conversions géniques ;
- Un contrôle *in situ* (Changement de site d'expression actif) sans altération de l'ADN.

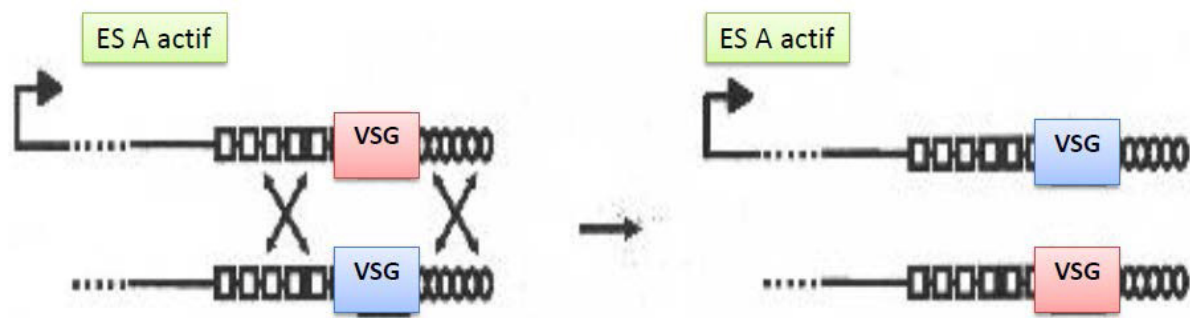


Figure N° 28 : Recombinaison réciproque des séquences de gènes de VSG

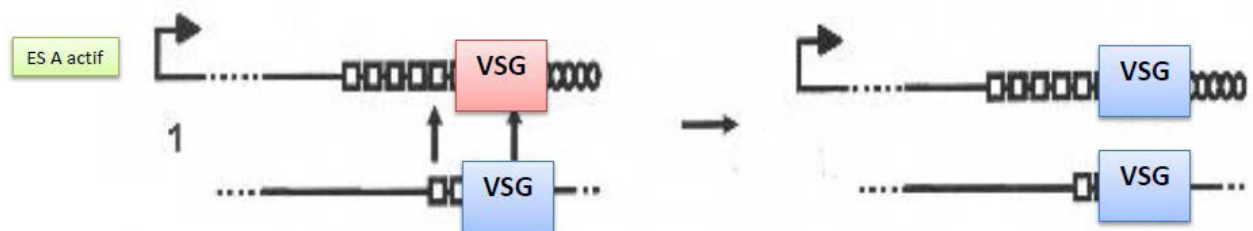


Figure N° 29: Conversion génique dans les gènes de VSG

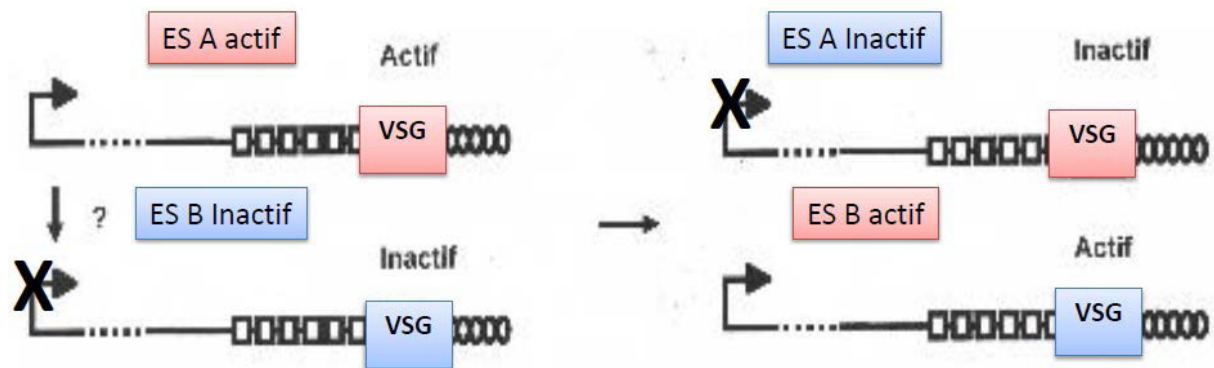


Figure N° 30 : Activation *in situ* dans les gènes de VSG

(<http://worforce.calu.edu/Buckelew/images/Trypanosoma%20Obrucei%20gambiense.jpg>)
(Sept. 2013)

Recombinaison réciproque ou homologue

Elle consiste en un échange des séquences d'ADN entre deux régions par reconnaissance de séquences homologues (Fig. 28) et concerne les gènes télomériques. La recombinaison se fait entre deux gènes de VSG appartenant à des sites d'expression différents.

Conversion génique

Elle consiste à un remplacement d'une séquence d'ADN par une copie d'une autre séquence (Fig. 29), c'est une recombinaison entre un gène de VSG et un autre gène de VSG copié à partir de l'un de nombreux pseudogènes.

Activation *in situ* (changement de site d'expression)

Elle consiste à l'inactivation d'un site A actif au profit d'un site B préalablement inactif, sans déplacement de séquence d'ADN, cela conduit à l'expression d'un VSG différent. Il existe 20 sites (ES) et un seul est actif à un moment donné (Fig. 30).

De nouvelles séquences de VSG sont donc ainsi générées ce qui permet l'élargissement à l'infini du répertoire de VSG.

Les anticorps dirigés contre les constituants variants des trypanosomes se lient à la surface membranaire des parasites et participent à la diminution de la parasitémie observée au cours de l'infection. Les quelques trypanosomes porteurs des VSG nouvellement modifiées peuvent donc échapper aux anticorps produits par le sujet infecté, ces variants se multiplient pour former la vague de parasitémie suivante (Molyneux *et al.*, 1996) (Fig. 31). Cette protéine peut cependant jouer d'autres fonctions dans l'adaptation du parasite à son hôte. Par ailleurs, certains anticorps trouvés dans la THA sont dirigés contre des auto-antigènes et correspondent à l'activation non spécifique des lymphocytes B, qui produisent naturellement des auto-anticorps (Guilbert *et al.*, 1982).

Cette propriété empêche la plupart des hôtes en contact avec les trypanosomes du groupe *brucei* d'acquérir une véritable immunité protectrice. La mise en évidence dans le trypanosome de constituants stables, tels que des glycoprotéines non variables de surface ou des épitopes stables du flagelle du trypanosome, est un facteur d'espoir dans cette recherche vaccinale (Overath *et al.*, 1994). La présence du trypanosome dans le circuit sanguin de son hôte induit aussi l'apparition d'anticorps anti-tryptophane like, ce qui souligne que la VSG présente des domaines riches en tryptophane (Okomo *et al.*, 1995 ; Semballa *et al.*, 2007).

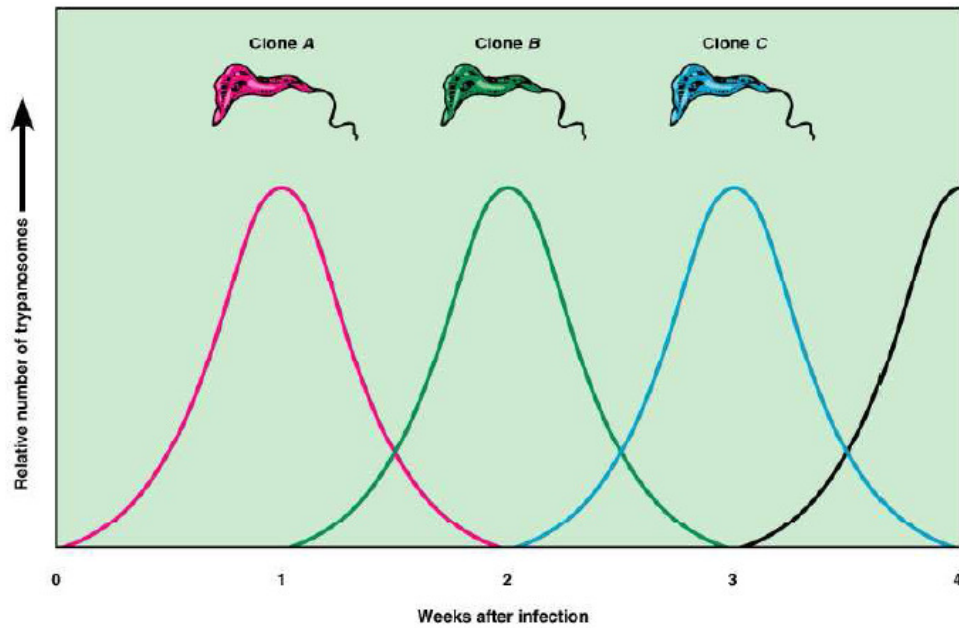


Figure N° 31 : Variation antigénique des trypanosomes (Commutation antigénique)

(http://diverge.hunter.cuny.edu/~weigang/Images/22-15_trypanosomes_1.jpg) (mai 2013)

En plus de l'induction de la production exagérée et persistante de cytokines, des anticorps et auto anticorps, la VSG induit la résistance à la lyse médiée par le complément (Taylor *et al.*, 2006).

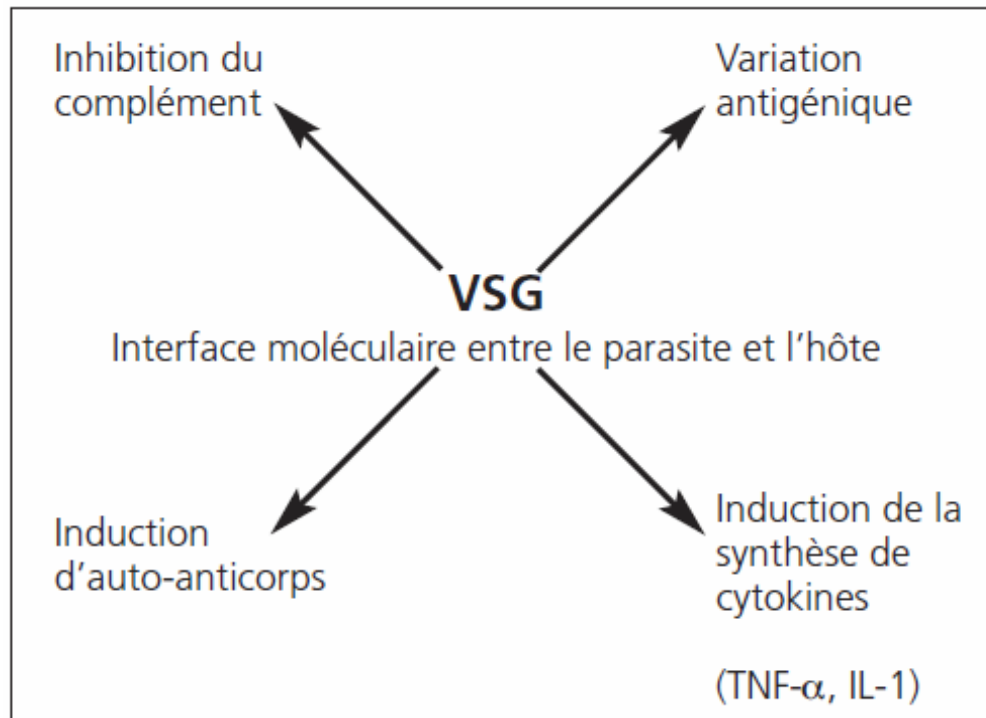


Figure N° 32 : VSG, Interface moléculaire entre parasite et l'hôte (d'après Vincendeau et Bouteille, 2006).

➤ **Inhibition de la lyse médiée par le complément**

Les parasites du complexe *brucei* échappent à la lyse médiée par le complément, en empêchant la poursuite de la cascade de réaction au niveau de C3 convertase. Ce blocage de la voie alternative du complément par la VSG, inhibe la lyse du parasite (Devine *et al.*, 1986).

➤ **Fixation de la région Fc des immunoglobulines**

Trypanosoma musculi porte sur sa membrane des récepteurs pour la région Fc des immunoglobulines (Vincendeau *et al.*, 1989), ce qui lui permet d'éviter les fonctions effectrices liées à la région Fc de ces molécules, tout en se revêtant de molécules de l'hôte le protégeant. Caractéristique non retrouvée ailleurs, un de ces récepteurs fixe de façon identique, l'IgM et l'IgE, les deux Ig possédant des chaînes lourdes ayant 5 domaines.

➤ **Hyper prolifération des LB et production d'auto anticorps**

Dans la THA, la principale caractéristique est une augmentation spectaculaire du taux des immunoglobulines (surtout IgM), comprenant des anticorps spécifiques aux trypanosomes (VSG et autres composants du parasites) et des anticorps non spécifiques. Les souris infestées par *T. b. brucei* produisaient lymphocytes B aberrants (Sacco *et al.*, 1994). Des études supplémentaires ont démontré que c'est l'ADN de *T. b. brucei* qui stimule la prolifération de ces cellules B (Shoda *et al.*, 2001). L'hyperstimulation de ces cellules B favorise la production d'auto-anticorps. Cette production d'auto-anticorps résulte aussi de la libération d'auto-épitopes par les tissus endommagés au cours de l'inflammation chronique. Il a été démontré également que les anticorps antineurofilament reconnaissent un épitope commun présent sur les neurones de l'hôte et le flagelle du trypanosome, ce qui montre l'existence d'un mimétisme moléculaire (Pentreath *et al.*, 1992). Par contre, il a été également montré que l'infection par *T. b. brucei* entraîne l'apoptose des lymphocytes B (Radwanska *et al.*, 2008).

➤ **Modulation de la réponse inflammatoire**

Les trypanosomes sont capables d'inhiber la réponse inflammatoire toxique pour l'hôte, au profit d'une réponse non inflammatoire, moins toxique (Baetselier *et al.*, 2001).

Dans un modèle de trypanotolérance / trypanosusceptibilité, *T. b. brucei*, dans la phase précoce de l'infection, la réponse pro-inflammatoire par l'activation classique des macrophages initiée par les cytokines Th1 et les produits du parasite va contrôler la parasitémie. Plus tard s'établit la réponse anti-inflammatoire sous le contrôle des cytokines Th2, à l'origine de l'activation alternative (Namangala, 2011). Dans un modèle de la trypanosomose murine à *T. congolense*, il est signalé une modification de la chronologie de la réponse le passage rapide de la réponse pro-inflammatoire à la réponse anti-inflammatoire (Baetselier *et al.*, 2001).

➤ **Dérégulation du réseau des cytokines**

Les VSG déclenchent la production de TNF- α par les macrophages (Magez *et al.*, 1998 ; Daulouède *et al.*, 2001). De plus, la production de TNF- α peut être stimulée par l'IFN- γ . IFN- γ et TGF- β sont produits par les cellules T CD8⁺ activées par une molécule synthétisée par les trypanosomes, le TLTF (Olsson *et al.*, 1991). Le TGF- β possède des propriétés immunosuppressives. Un fait intéressant est que l'IFN- γ stimule la croissance du parasite. L'IFN- γ induit de l'IDO, enzyme également impliquée dans l'immunomodulation (Liang *et al.*, 2013).

En interférant avec le réseau des cytokines et en utilisant les cytokines comme facteurs de croissance, les trypanosomes modifient les fonctions effectrices du système immunitaire. La première évidence d'une surproduction de TNF- α a été observée chez le lapin infecté par *T. b. brucei* avec fièvre, asthénie, cachexie et hypertriglycémie.

➤ **Inhibition de la réponse des lymphocytes T**

Dans les trypanosomoses, des altérations des fonctions de LT ont été démontrées *in vivo* et *in vitro*. La suppression des réponses des lymphocytes T de l'hôte, impliquant en outre les cellules macrophagiques, est l'une des caractéristiques de l'infection par les trypanosomes africains. Le déficit en L-arginine dû à son catabolisme par la iNOS ou l'arginase, provoque une déplétion de cet acide aminé nécessaire à la prolifération des LT. L'inhibition de LT est liée aussi à l'expression de l'IDO. Dans les processus infectieux, l'activité IDO a d'abord été identifiée comme un mécanisme de défense contre les invasions microbiennes car il induit la

diminution du tryptophane, élément essentiel à la prolifération de bactéries, de parasites et de virus (Zelante *et al.*, 2009). La déplétion de tryptophane entraîne l'inhibition de certains pathogènes notamment *Toxoplasma gondii* et *Chlamydia psittaci* (Byrne *et al.*, 1986 ; Murakami *et al.*, 2012). Par ailleurs, l'expression de IDO dans les cellules dendritiques et les macrophages a maintenant été impliquée dans l'induction de la tolérance, principalement en induisant l'apoptose des lymphocytes T, l'anergie et la génération de lymphocytes T régulateurs (Grohmann *et al.*, 2003 ; Mellor *et al.*, 2004). Il a été démontré que l'infection des cellules dendritiques humaines dérivées des cellules myéloïdes par *Leshmania major* et *L. donovani* induit l'expression d'IDO, supprimant ainsi la prolifération des lymphocytes et aussi le processus inflammatoire (Donovan *et al.*, 2012).

➤ **Activation de TCD8 par une molécule dérivée du parasite (TLTF)**

T. b. brucei produit une trypanokine, le TLTF (T lymphocyte-triggering factor) qui entraîne la sécrétion, par les cellules TCD8+, d'INF- γ , qui, à son tour, stimule la croissance des parasites (Bakhiet *et al.*, 1993 ; Olsson *et al.*, 1993). Il s'est établi une relation bidirectionnelle entre *T. b. brucei* et cellules T CD8+. TLTF stimule la production d'IFN- γ qui à son tour stimule la production de TLTF (Hamadien *et al.*, 2000). *T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. evansi*, contiennent également des facteurs ayant une activité similaire et ces réponses sont dépendantes de CD8 puisque l'activité a été bloquée par un anti-CD8 (Bakhiet *et al.*, 1996).

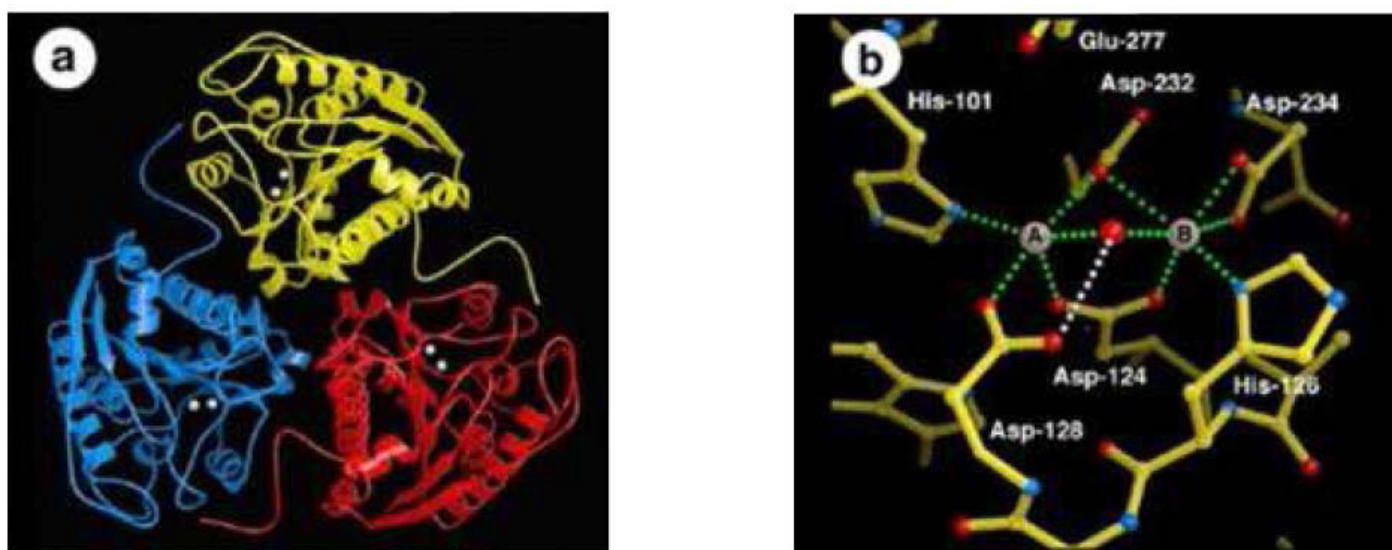


Figure N° 33 : Structure de l'arginase 1 de rat (a) et de son site catalytique (b) avec en son centre un cluster de 2 ions Mn^{2+} (A et B) (Kanyo *et al.*, 1996).

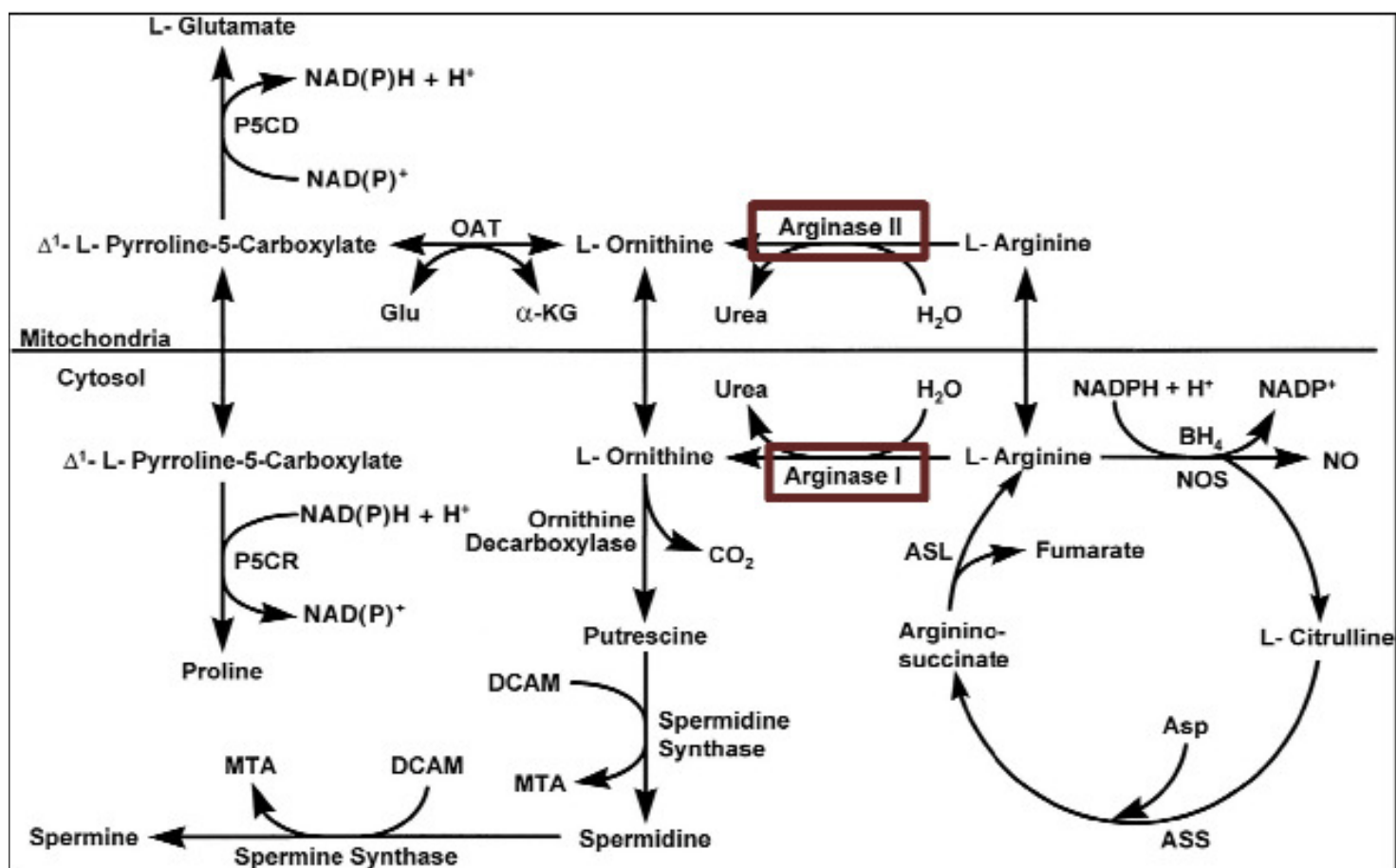


Figure N°34 : Métabolisme de l'arginine dans les cellules de mammifères (Li *et al.*, 2001)

1.3 Arginase

Un nouveau mécanisme favorisant la prolifération du parasite, l'induction de l'arginase de l'hôte, a été mis en évidence dans notre laboratoire (Gobert *et al.*, 2000).

Nous allons rappeler la localisation cellulaire, la structure, les propriétés physicochimiques et les fonctions des arginases, décrire les voies de signalisation intracellulaire aboutissant à la transcription et l'expression de l'arginase et donner quelques exemples de pathologies où elles sont impliquées.

1.3.1 Localisation, Structure et Propriétés physico-chimiques

L'arginase ou aminohydrolase ou L-arginine urée hydrolase est une enzyme largement distribuée dans le monde vivant. Elle est présente chez les bactéries, les parasites, les champignons, les plantes, les animaux vertébrés et invertébrés. Chez les mammifères, il existe deux isoformes : arginase 1 et arginase 2, codées par deux gènes différents, localisés sur deux chromosomes différents. Ces deux isoformes présentent environ 60% d'homologie de structure en acides aminés, mais 100% d'homologie au niveau du site catalytique (Cederbaum *et al.*, 2004). Arginases 1 et 2 permettent la synthèse de polyamines et de proline.

L'arginase 1 ou encore arginase hépatique est l'isoforme la mieux explorée. Localisée dans le cytosol des hépatocytes, elle est impliquée dans le cycle de l'urée. Elle est également localisée dans le cytosol des cellules de nombreux tissus extra hépatiques (dans lesquels le cycle de l'urée est incomplet) : la peau, les intestins, les érythrocytes, les leucocytes, les cellules endothéliales.

L'arginase 2 ou encore arginase rénale est une enzyme localisée dans la face externe de la membrane mitochondriale. Elle est exprimée dans de nombreux tissus dans lesquels le cycle de l'urée est incomplet : les reins, le cerveau, le cœur, les vaisseaux, les poumons, les intestins, la prostate, les leucocytes.

La structure cristallographique des arginases humaines a été déterminée pour l'arginase 1 (Cox *et al.*, 1999), et pour l'arginase 2 (Cama *et al.*, 2003). L'enzyme est active sous la forme d'un homotrimère possédant en son centre un cluster de 2 ions manganèse Mn^{2+} (Fig. 33). Ces deux atomes de Mn^{2+} , présents au niveau du site catalytique, sont nécessaires pour son activité catalytique. Ils permettent la fixation et l'hydrolyse du substrat. L'activité arginase est fortement diminuée dans un milieu déplété en Mn^{2+} (Wu et Morris, 1998 ; Cederbaum *et al.*, 2004). L'ion Mn^{2+} serait donc l'activateur physiologique de l'arginase. L'homotrimère de l'arginase hépatique a un PM de 105 kDa et chacune des 3 sous-unités a un PM de 35 kDa.

1.3.2 Fonction des arginases

1.3.2.1 Cycle de l'Urée

La fonction fondamentale dédiée à l'arginase est le cycle de l'urée. Elle catalyse la dernière réaction du cycle de l'urée en hydrolysant la L-arginine en urée et L-Ornithine. Ainsi, du cytosol des hépatocytes, l'urée est transportée dans la circulation sanguine et est excrétée par les reins. La L-ornithine est utilisée pour régénérer la L-arginine dans les hépatocytes.

1.3.2.2 Synthèse de l'ornithine plaque tournante de plusieurs voies métaboliques

L'arginase catalyse la production de l'ornithine, acide aminé au carrefour de multiples métabolismes. L'ornithine peut être catalysée par l'ODC en putrescine puis en spermidine et en spermine, polyamines nécessaires pour la croissance cellulaire et le remodelage des tissus (Fig. 33). Elle peut également être catalysée par l'OAT en Proline, nécessaire pour la synthèse de plusieurs protéines structurales, dont le collagène (Durante *et al.*, 2001), du glutamate, de l'acide γ -aminobutyrique (Yu *et al.*, 2003).

1.3.2.3 Prolifération cellulaire et synthèse de collagène

L'arginase participe à la synthèse de collagène et à la réplication des fibroblastes. De nombreux travaux ont montré l'étroite relation entre les niveaux importants d'expression et d'activité arginase et la prolifération cellulaire. La néo-vascularisation, étape essentielle dans le développement des métastases et des tumeurs, dépend de l'activité arginase et de la synthèse des polyamines (Davel *et al.*, 2002).

1.3.2.4 Arginase et relaxation musculaire

Le NO est le principal régulateur des fonctions érectiles du corpus cavernosum. Il intervient dans les phases d'érection/relaxation. La présence de l'arginase dans les cellules endothéliales permet de réguler l'activité vasculaire et de ce fait, la pression artérielle. Elle joue également un rôle sur la contraction cardiaque et pulmonaire. Dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, Li a démontré le rôle important des deux isoformes de l'arginase et leur implication dans la synthèse des polyamines nécessaires à l'angiogénèse (Li *et al.*, 2002).

1.3.2.5 Régulation et homéostasie du système immunitaire

➤ **Modulation de la production de NO : Balance Arginase/NOS**

Les implications principales de l'arginase dans l'immunité sont la régulation de la synthèse du NO par inhibition de iNOS dans les macrophages de façon compétitive, et la réparation tissulaire post inflammatoire et la cicatrisation. Le monoxyde d'azote joue un rôle très important dans l'immunité (Coleman *et al.*, 2001), le NO stimule la croissance de la lignée mononucléée à partir des cellules souches CD34+ lors de l'hématopoïèse (Tiribuzi *et al.*, 2013). Sous l'effet des cytokines du type Th1 et du LPS, les macrophages soumis à une activation classique produisent du NO qui intervient contre des agents tumoraux ou infectieux (Vouldoukis *et al.*, 1996). Le NO et ses dérivés induisent des altérations enzymatiques et nucléaire, et la mort cellulaire par apoptose. Il présente une grande affinité pour le fer ; ainsi, il module des enzymes contenant le fer. Le NO possède un électron célibataire qui lui confère un état radicalaire. Contrairement à la plupart des radicaux libres, il ne se dimérise pas, et ne se dismute pas : c'est un radical libre cytotoxique et cytostatique. Par contre, le NO a aussi des effets délétères sur l'organisme. Il est impliqué dans les maladies inflammatoires chroniques comme la polyarthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques. Dans l'asthme, il participe à l'inflammation et à l'œdème des voies respiratoires. Ainsi la régulation de la production de NO est nécessaire pour limiter ces effets néfastes pour l'organisme hôte. La régulation de NO par l'arginase s'explique par le fait que l'arginase et la iNOS utilisent le même substrat qui est la L-arginine (Fig. 31). Par ailleurs, la compétition est en faveur de l'arginase, qui présente une constante de dissociation K_d et une activité V_m , respectivement d'environ 100 fois et 1000 fois plus grande pour le substrat que la NOS (Boucher *et al.*, 1994). Plusieurs travaux réalisés sur la compétition Arginase / NOS2 ont été réalisés et démontrent plusieurs points :

- 90% de la L-arginine sont consommés par l'arginase et seulement 10% sont utilisés pour la synthèse de NO et l'utilisation d'un inhibiteur compétitif sélectif de l'arginase, la L-norvaline restaure la production de NO (Chang *et al.*, 1998 ; Gobert *et al.*, 2000 ; Balestieri *et al.*, 2002) ;
- L'induction et l'expression de l'arginase plus précoces que celles des NOS entraînent une diminution significative du pool intra et extracellulaire de L-arginine, inhibant la production de NO (Duleu *et al.*, 2004) ;
- Une diminution importante de la concentration en L-arginine plasmatique a été observée chez des cobayes infectés par *T. b. gambiense* (Furfine *et al.*, 1993) ;

- Une prolifération de *T. b. brucei* accompagnée d'une forte augmentation de l'activité arginase a été constatée dans la cavité abdominale de souris infectées (Gobert *et al.*, 2000).

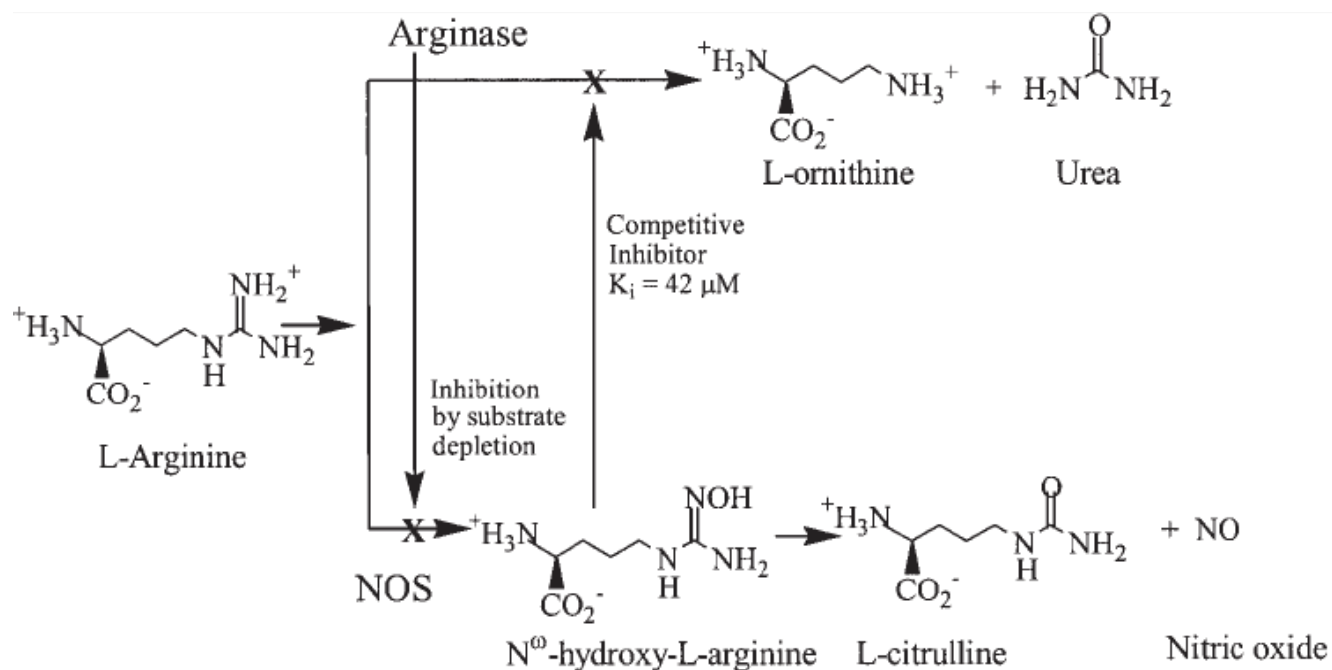


Figure N° 35: Relation entre l'activité arginase et NO synthase (Heffernan *et al.*, 2006)

Induction de l'hypo réactivité des lymphocytes T par l'arginase

La L-arginine est un facteur clé dans l'activation et la fonction de LT. Sa déplétion provoque le dysfonctionnement des lymphocytes T (Taheri *et al.*, 2001). L'appauvrissement en L-arginine altère la fonction des LT par diminution de l'expression de la chaîne CD3 du TCR et réduction de la prolifération des LT (Zabaleta *et al.*, 2004). *Helicobacter pylori* induit l'arginase qui consomme de la L-arginine, ce qui crée un état d'hyporéactivité des LT (Zabaleta *et al.*, 2004). L'activité arginase est l'un des mécanismes contribuant à la suppression de la réponse immunitaire maternelle par réduction de la biodisponibilité en L-arginine, conduisant à l'immunotolérance et à la survie du fœtus semi-allogénique (Kropf *et al.*, 2007).

1.3.3 Voie de signalisation, activation de la transcription et expression de l'arginase

Les voies d'induction de l'arginase macrophagique murine sont assurées par plusieurs ligands qui activent divers récepteurs, à l'origine de la transduction d'une multitude des signaux, déclenchant une série des facteurs de transcription aboutissant à l'expression de

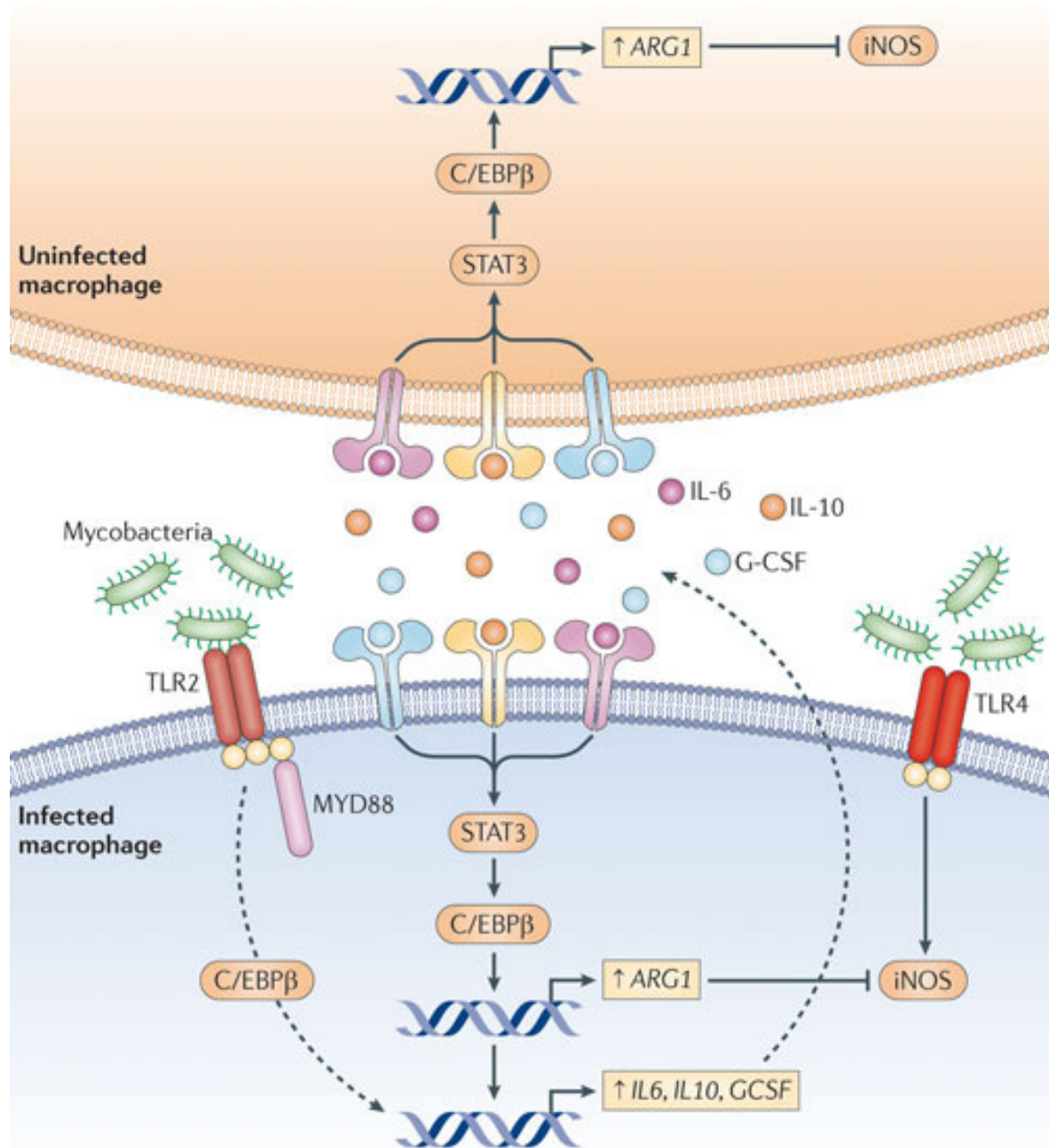
l'arginase. Les cytokines (IL-4, IL-10, IL-13), les facteurs de croissance et d'autres molécules sont capables d'activer indépendamment ou en combinaison la voie de l'arginase. Le facteur de transcription le plus important pour l'arginase 1 est le STAT6 (Sinha *et al.*, 2005), bien que d'autres facteurs sont indépendants de STAT6. Ces facteurs se lient à des sites distincts et spécifiques pour initier la transcription et l'expression du gène de l'arginase 1.

1.3.3.1 Transduction du signal, activation et expression de l'arginase par les cytokines

La régulation transcriptionnelle de Arginase 1 par l'IL-4 décrite dans la lignée cellulaire de macrophages murins RAW264.7, met en évidence l'activation du facteur de transcription STAT6 puis C/EBP β et enfin la combinaison des facteurs STAT6, C/EBP β et d'un facteur X préalablement induit par STAT6 (Pauleau *et al.*, 2004 ; Gray *et al.*, 2005). L'activation du récepteur IL-4 permet l'autophosphorylation de JAK qui phosphoryle STAT qui se dimérise avant d'entrer dans le noyau pour coopérer avec PU1, C/EBP β et X pour former un complexe au niveau du promoteur afin d'initier la transcription et l'expression de l'arginase (Pauleau *et al.*, 2004) (Fig. 36).

L'IL-13 emprunte la même voie de signalisation intracellulaire que l'IL-4 pour induire l'expression de l'arginase (Fig. 37). L'activation de l'IL-13R associé à IL-4R α par l'IL-13 induit le JAK1/TyK2 qui phosphoryle et dimérise le STAT6 qui assure la transcription de l'ARN de l'arginase. Par contre l'activation du IL-13R ne transmet pas le signal (Ingram *et al.*, 2012).

Dans d'autres modèles, l'IL-4 active simultanément KLF4 qui potentialise l'effet de STAT6 sur l'expression de l'arginase (Liao *et al.*, 2011). L'association IL-4 et IL-10 active le PU.1 qui induit l'expression de l'arginase (Pauleau *et al.*, 2004). L'activation du récepteur TLR 2 déclenche une cascade de signalisations aboutissant à l'expression et à la production de IL-6, IL-10 et G-SCF via C/EBP. La combinaison de ces trois cytokines active P-STAT3 qui active à son tour C/EBP qui induit l'expression de l'arginase (Qualls *et al.*, 2010 ; Hajishengallis *et al.*, 2011) (Fig. 38). Cette voie de signalisation pourrait expliquer l'induction et l'expression de l'activité arginase par *Toxoplasma gondii* par la voie de TLR et indépendamment du facteur de transcription STAT6 (Kasmi *et al.*, 2008).



Nature Reviews | Immunology

Figure N° 38: Voie de signalisation conduisant à l'induction de l'arginase via TLR2 et STAT3 (Hajishengallis *et al.*, 2011)

1.3.3.2 Rôle de lipoprotéines oxydées ou acétylées dans l'induction de l'arginase

Les LDL (Low Density Lipoprotein) oxydés ou acétylés induisent l'expression et l'activité arginase via le récepteur nucléaire PPAR γ/δ qui s'associe à RXR pour activer le promoteur d'expression de l'arginase (Khallou *et al.*, 2010 ; Pourcet et Pineda-Torra, 2013). La phospholipase A2, activée par MAPK-p38, métabolise l'acide arachidonique en prostaglandine. La prostaglandine active les récepteurs PPARs pour induire la transcription et l'induction de l'arginase. La Vitamine D3 associé à L'INF- δ , active le récepteur VDR qui induit l'expression de l'arginase (Ehrchen *et al.*, 2007 ; Pourcet et Pineda-Torra, 2013) (Fig. 39).

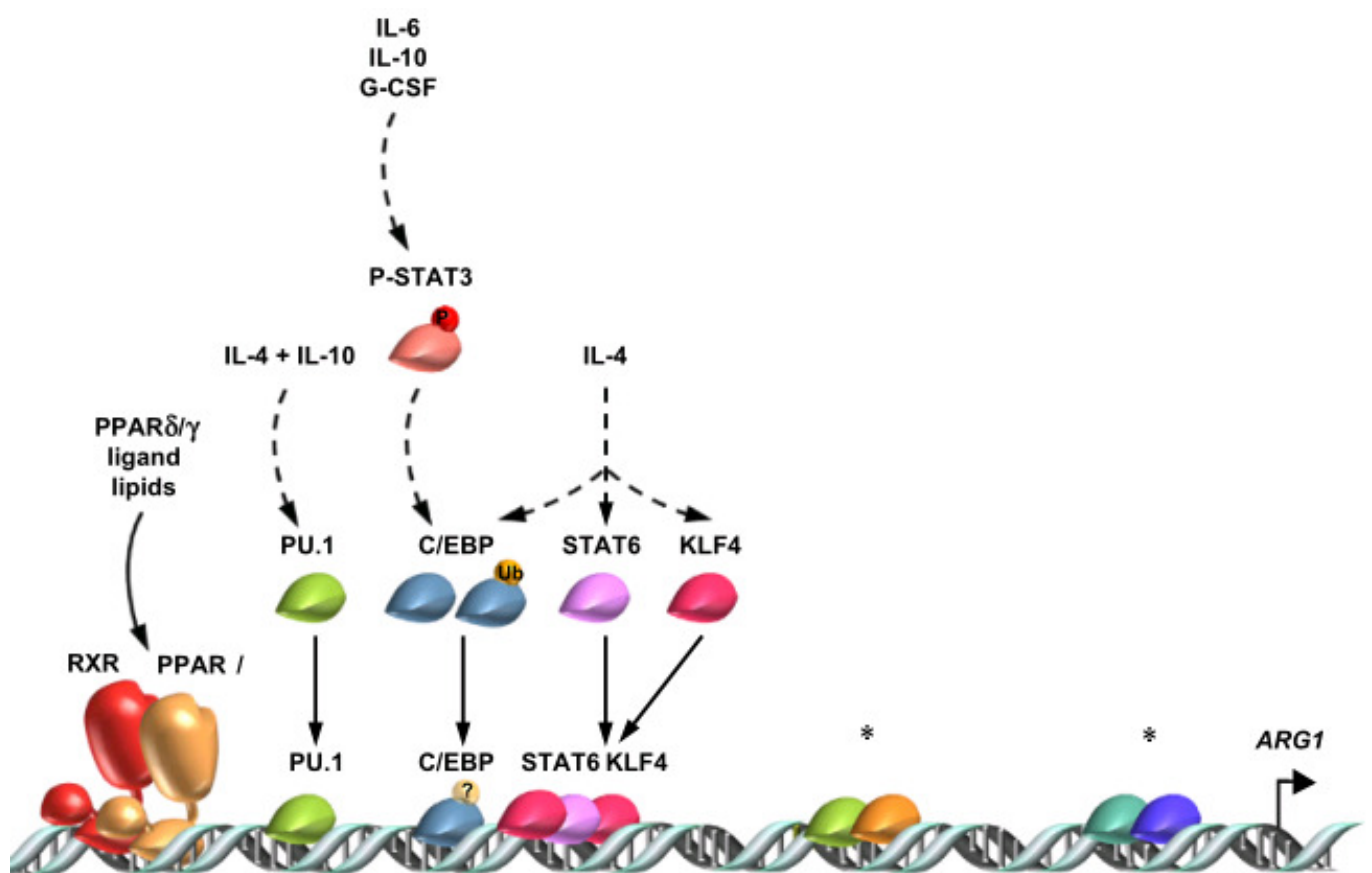


Figure N° 39 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation intracellulaire aboutissant à l'induction de l'arginase (Pourcet et Pineda-Torra, 2013).

1.3.3.3 Voie d'induction de l'arginase par un parasite intracellulaire

La Cruzipaïne (Cz) glycoprotéine soluble de *Trypanosoma cruzi* induit l'activité arginase par divers signaux intracellulaires (Fig. 40). La Cz active le récepteur tyrosine kinase qui peut à son tour activer le PKA ou la MAPK p38, deux voies qui aboutissent à l'expression de l'arginase.

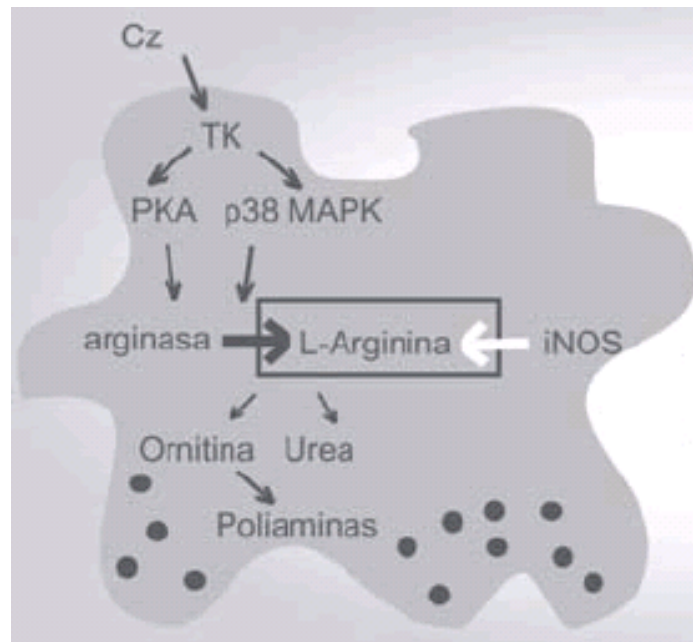


Figure N° 40: Signalisation intracellulaire aboutissant à l'induction de l'arginase par la cruzipaine de *T. cruzi* (Stempin *et al.*, 2007)

1.3.4 Exemples de pathologies liées à l'arginase

1.3.4.1 Pathologies parasitaires

➤ Arginase et Trypanosomoses

Le rôle du monoxyde d'azote dans la réponse de l'organisme a été étudié par plusieurs équipes et sur plusieurs modèles, car le NO joue un rôle important dans le système immunitaire. Dans le cas de la trypanosomose, plusieurs aspects ont été développés et élucidés :

- *In vitro*, les trypanosomes extracellulaires du groupe *brucei* sont très sensibles aux dérivés des NO (Gobert *et al.*, 1998), une persistance de la prolifération du parasite a été observée dans la trypanosomose murine à *T. b. brucei* (Gobert *et al.*, 2000) ; et, l'injection de la L-arginine augmente la production de NO₂⁻ (Gobert *et al.*, 2000) ;
- Des mesures directes du NO cérébral ont été réalisées chez le rat et chez la souris infectées par le *T. b. brucei* et la concentration du NO cérébral est plus élevée chez les animaux infectés que les animaux non infectés (Buguet *et al.*, 1996 ; Amrouni *et al.*, 2010).

Les différents travaux sur les effets cytotoxiques et cytostatiques du NO ont amené des équipes concernées à étudier les mécanismes de modulation du NO. Ainsi, des mécanismes de

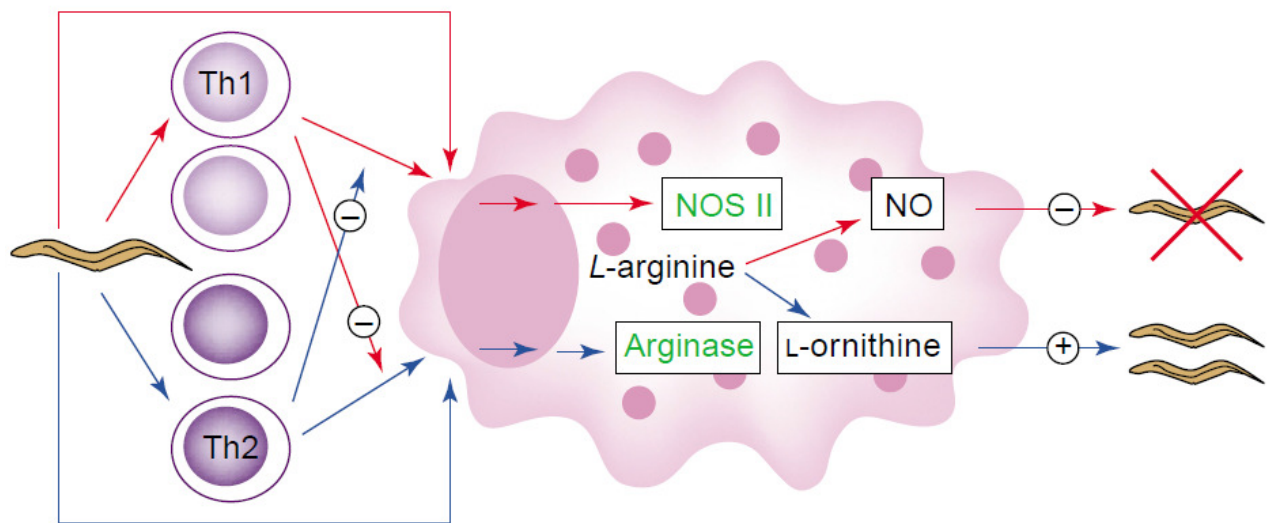
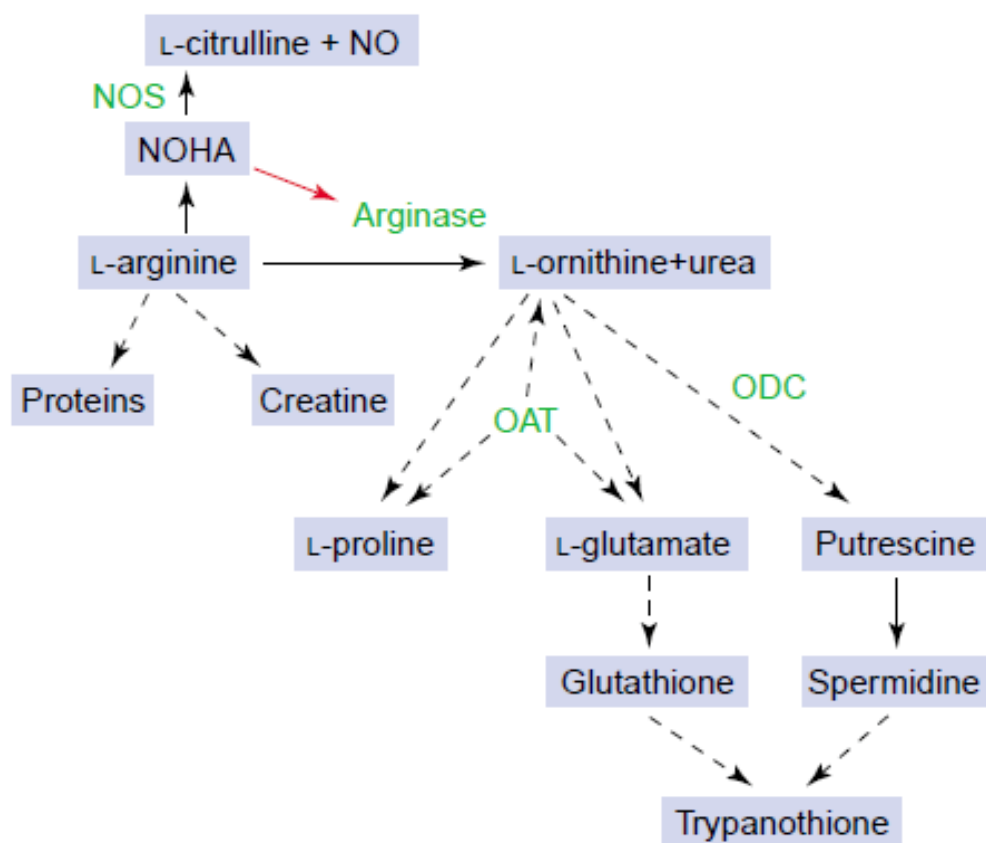


Figure 41 : Equilibre iNOS/arginase, dans les trypanosomoses (Vincendeau *et al.*, 2003).



TRENDS in Parasitology

Figure N°42 : Voie métabolique de L-arginine et de L-Ornithine (Vincendeau *et al.*, 2003)

régulation mis en jeu dans la diminution du NO ont été abordés par l'étude des cytokines stimulantes et inhibitrices de iNOS des macrophages (Namangala *et al.*, 2001). La balance

NOS/Arginase est sous contrôle de la balance Th1/Th2, avec les cytokines de Th1, qui induisent la iNOS, et les cytokines Th2 qui induisent l'arginase (Munder *et al.*, 1999) (Fig. 41).

L'arginase macrophagique inhibe l'élimination des trypanosomes dépendant du NO *in vitro* et *in vivo*. (Duleu *et al.*, 2004). L'addition simultanée de l'IL-1 β , l'INF- γ et du TNF- α ou de chimiokines à des cultures *T. cruzi* / macrophage a donné lieu à l'induction de l'iNOS, des niveaux élevés de nitrite, et une activité trypanocide marquée (Machado *et al.*, 2000). Dans une étude sur la trypanosensibilité et la trypanorésistance des souris Balb/c et C57bl/6 à l'infection à *T. b. brucei*, l'expression et le rôle de la NO synthase inductible et de l'arginase ont été évalués sur les deux souches de souris. L'expression de l'ARNm de l'arginase 1 et 2 et l'activité de l'arginase sont plus élevées dans les macrophages des souris Balb/c infectées, que dans ceux des souris C57bl/6. Le niveau de ARNm de iNOS est le même dans les macrophages des deux souches. Le niveau élevé de l'activité arginase chez macrophages Balb/c infectées par *T. b. brucei* a inhibé fortement la production de NO (Duleu *et al.*, 2004). Il a été montré que la proline, un des dérivés de l'ornithine, constitue une source de carbone indispensable pour les trypanosomatidés au niveau de l'insecte (Bringaud *et al.*, 2012). Dans la trypanosomose à *T. cruzi*, l'interaction entre cruzipaine (antigène immunodominant du parasite) et le macrophage induit l'activité arginase qui déplete la L-arginine au détriment de la NO synthase régulant ainsi la production du NO (Garrido *et al.*, 2011).

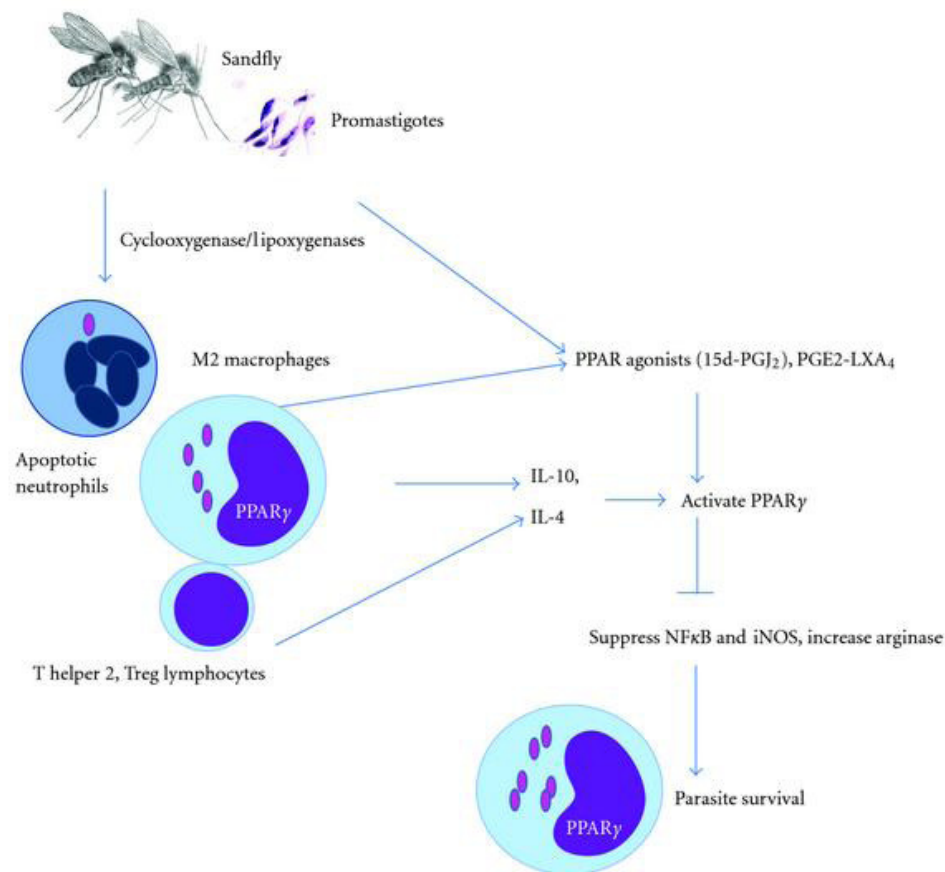


Figure N° 43: Schéma d'interaction *L. donovani* Macrophage (Chan *et al.*, 2012)

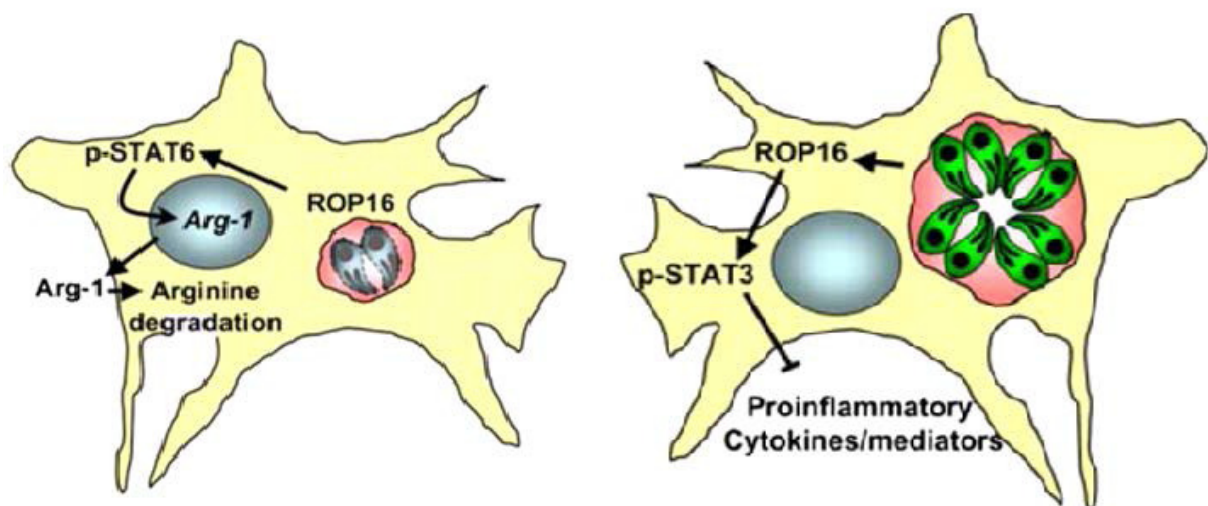


Figure N° 44 : Voie de signalisation de l'induction de l'arginase dans la toxoplasmose (Denkers *et al.*, 2011)

➤ Arginase et Leishmaniose

Lors de la piqûre des phlébotomes infestés, les macrophages sont recrutés sur le site d'inflammation, les promastigotes entrent ainsi dans les macrophages recrutés. Les parasites induisent la production des activateurs de PPARs. Les agonistes de PPARs tels que les lipides bioactifs 15d-PGJ2 et LXA4 des voies de l'acide arachidonique sont libérés. L'IL-4 produit par les Th2 peut aussi activer les PPARs. L'activation du récepteur PPAR γ polarise les macrophages de l'hôte vers l'activation alternative qui produirait de l'arginase pour détourner le substrat de iNOS et donc de réduire la production de NO (Adapala *et al.*, 2008 ; Chan *et al.*, 2012) (Fig. 43).

➤ Arginase et Toxoplasmose

La modulation du système immunitaire par *Toxoplasma gondii* contribue à l'installation de l'infection (Hunter *et al.*, 2012). Il est réputé comme un régulateur de la réponse inflammatoire (Melo *et al.*, 2011). Le parasite sécrète un facteur, le ROP16 (Rhoptry Protein 16) qui phosphoryle les voies des transcriptions STAT3 et STAT6 aboutissant respectivement à l'activation de l'expression des gènes de l'IL-10 et l'arginase, facilitant l'établissement de l'infection (Butcher *et al.*, 2005 ; Butcher *et al.*, 2011). Le *T. gondii* induit aussi l'activité arginase macrophagique via TLR, indépendamment du STAT (El Kasmi *et al.*, 2008) (Fig. 44).

➤ Arginase et amibiase

Entamoeba histolytica exprime de l'arginase qui consomme de la L-arginine de l'hôte, ce qui permet sa prolifération et limite en même temps la production de NO amoebicide (Elnekave *et al.*, 2003).

➤ Arginase et Schistosomose

Schistosoma mansoni induit l'activité arginase macrophagique de son hôte dans son stade de développement (Fitzpatrick *et al.*, 2009). L'expression de l'ARNm de l'arginase 1, la traduction et l'activité arginase 1 est décelée dans les macrophages murins infectés de *S. mansoni* (Hesse *et al.*, 2001).

➤ Arginase et paludisme

Plasmodium falciparum et *Plasmodium berghei* expriment une arginase dont le poids moléculaire (160 kDa) est plus grand que celui de l'enzyme trouvé chez la souris ou chez l'homme. Cette arginase parasitaire catalyse la L-arginine au détriment de la iNOS pour la biosynthèse des polyamines nécessaires à la prolifération du parasite (Müller *et al.*, 2005). L'augmentation de l'arginase plasmatique est également présente dans le paludisme grave (Weinberg *et al.*, 2008). Des études sont en cours pour inhiber spécifiquement l'arginase parasitaire (Ilies *et al.*, 2011).

1.3.4.2 Autres pathologies impliquant l'arginase

L'activité arginase est impliquée dans plusieurs pathologies infectieuses et métaboliques:

- Une augmentation de l'activité arginase corrélée avec la gravité de la maladie est rapportée chez les séropositifs pour VIH (Clock *et al.*, 2010) ;
- L'activité arginase est élevée dans le cancer pancréatique (Porembska *et al.*, 2004), dans le cancer du sein (Cavdar, 2003), dans le cancer du poumon et certains cancers de la peau (Gökmen *et al.*, 1999 ; Gökmen *et al.*, 2011) ;
- L'induction de l'arginase endothéliale est un des mécanismes à l'origine du dysfonctionnement endothélial constaté dans l'hypertension artérielle (Bagnost *et al.*, 2010) et le diabète (Johanson *et al.*, 2003).

II

Travaux de recherche

2.1 Objectifs de l'étude

Des travaux antérieurs réalisés *in vitro* et *in vivo* sur des souris ont montré l'importance de l'induction de la voie de l'arginase par les parasites du groupe *brucei* dans le développement de la parasitose. Une prolifération de *T. b. brucei* est corrélée à une augmentation de l'activité arginase au niveau des macrophages péritonéaux de souris infectées (Gobert *et al.*, 2000). En outre, il a été aussi montré que l'augmentation de l'activité de l'arginase induite par le parasite *T. b. brucei* était plus élevée dans les macrophages de souris Balb/c par rapport à ceux de C57BL / 6, ce qui explique la plus grande sensibilité et susceptibilité de la lignée de souris Balb/c à l'infection par des trypanosomes (Duleu *et al.*, 2004). Une chaîne lourde de kynesine a été identifiée dans les facteurs de sécrétion de *T. b. brucei* comme candidat potentiellement capable d'induire l'arginase (De Muylder *et al.*, 2013).

Cependant, le modèle expérimental de la trypanosomose sur les souris, en utilisant les parasites du groupe *brucei*, est généralement à l'origine d'une augmentation exponentielle de la parasitémie et d'une infection murine aiguë et fatale au bout de quelques jours, ce qui ne permet pas de mettre en évidence les nombreuses relations hôte-parasite. En outre, la présence de VSG, glycoprotéine impliquée dans le mécanisme majeur d'échappement élaboré par le trypanosome peut interférer, ou masquer l'immunomodulation par la voie de l'arginase. Ainsi, nous avons choisi de travailler sur *T. musculi*, parasite naturel de la souris. De plus, ce parasite est dépourvu de VSG, ce qui élimine l'effet du phénomène de variation antigénique, permettant d'analyser la voie d'induction de l'arginase. Ce parasite a fait l'objet de nombreuses études pour l'évaluation du profil immunologique murin.

Avec ce parasite, nous avons fixé comme objectif de :

- Déterminer la cinétique de l'activité arginase *in vivo* en fonction du temps et les cibles moléculaires de l'hôte et du parasite impliquées ;
- Evaluer l'effet d'agent(s) interférant avec la voie d'induction de l'arginase.

Par ailleurs, nous avons voulu vérifier si ce mécanisme est conservé chez d'autres espèces de trypanosomes. Ainsi, un travail préliminaire nous a permis de mettre en évidence une activité arginase marquée dans les leucocytes totaux humains co-cultivés avec *T. b. gambiense*, ce qui nous a orienté vers l'évaluation du taux de l'arginase sérique dans le sérum des malades de THA, et qui constitue le deuxième objectif de notre étude. Enfin nous avons testé l'efficacité des agents thérapeutiques actuels dont un inhibiteur de la voie des polyamines, sur le *T. lewisi* parasite naturel de rat, à l'origine de la trypanosomose atypique chez l'homme.

Article N° 1

***Trypanosoma musculi* releases factors that promote parasite growth through mannose receptor-mediated arginase activation**

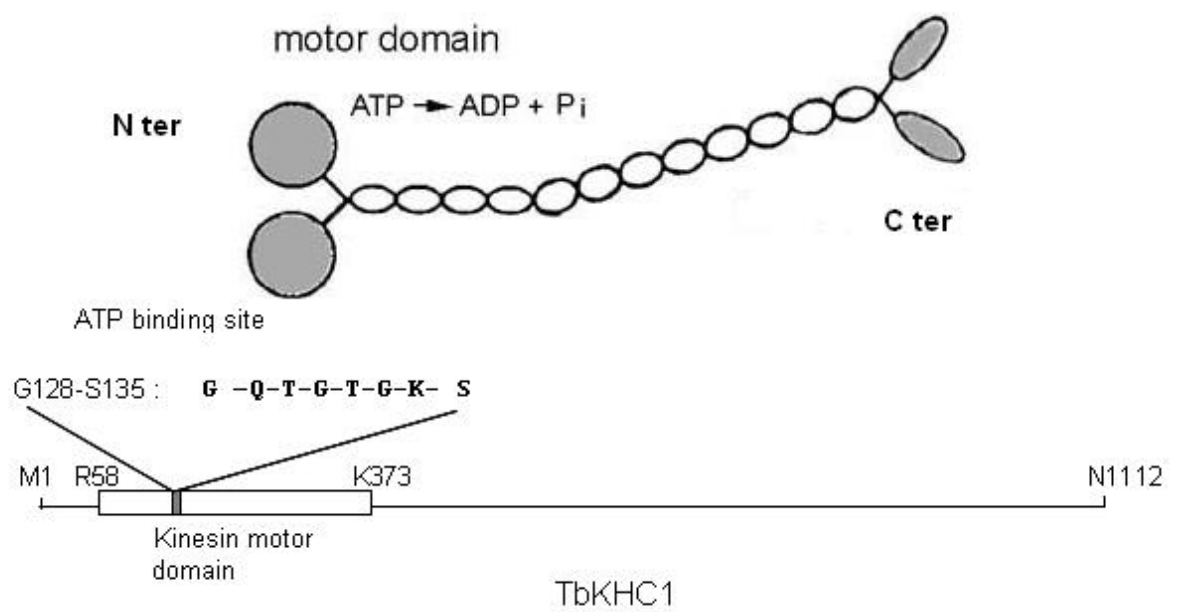


Figure 45 : Chaîne lourde de la kinésine orpheline identifiée chez *T. b. brucei*. (De Muylder *et al*, 2013)

Introduction

La coévolution hôte / parasite a permis aux parasites d'élaborer diverses stratégies pour échapper au système immunitaire et profiter des facteurs de croissance de l'hôte. En réponse aux parasites, le système immunitaire produit des molécules microbicides comme le monoxyde d'azote et ses dérivés (Green *et al*, 1990 ; Vincendeau et Daulouede, 1991). Le NO est produit dans les macrophages à partir de la L-arginine par la iNOS lors de l'activation classique des macrophages. La L-arginine est également hydrolysée par l'arginase dans l'activation alternative des macrophages pour donner urée et L-ornithine, acide aminé précurseur des polyamines, favorisant la prolifération des trypanosomes. Dans la trypanosomose murine expérimentale due au complexe *brucei*, il y'a induction de l'arginase macrophagique qui favorise la prolifération des *T. b. brucei* (Gobert *et al*, 2000). Un anticorps monoclonal (2C12) inhibant l'induction de l'arginase a été obtenu à partir des antigènes solubles de *T. b. gambiense*. Le criblage d'une banque génomique a permis l'identification de la chaîne lourde d'une kinésine orpheline de *T. b. gambiense* (Fig. 45). La protéine recombinante induit l'arginase macrophagique (De Muylder *et al*, 2013).

Nous avons étudié la trypanosomose murine à *Trypanosoma musculi*, parasite naturel de la souris, à l'origine d'une infection qui dure une vingtaine de jours contrairement aux trypanosomes du complexe *brucei* qui tuent la souris au bout de quelques jours. Ce parasite permet une étude plus en rapport avec les trypanosomoses humaines d'évolution chronique.

Plusieurs approches expérimentales nous ont permis de déterminer *ex vivo* la cinétique de l'activité arginase en fonction du temps, et d'évaluer l'induction *in vitro* de l'activité arginase par le parasite et ses facteurs solubles. L'effet du 2C12 sur l'activité arginase induite par *T. musculi* a été évalué. Les facteurs excrétés / sécrétés des parasites contiennent des sucres, ligands potentiels pour des lectines du type C comme le récepteur du mannose (Martinez- Pomares, 2012). Le mannose, inhibiteur du MMR (Soeiro *et al.*, 1999 ; Tsai *et al.*, 2013), est injecté aux souris pour évaluer l'incidence sur la parasitémie et l'activité de l'arginase. Les souris KO pour le récepteur mannose (Mrc1^{-/-}) ont été parasitées pour mettre en évidence le rôle de ce récepteur. Enfin, l'expression du MMR au niveau des macrophages des souris parasitées a été évaluée en comparaison avec les souris contrôles.

Trypanosoma musculi releases factors that promote parasite growth through mannose receptor-mediated arginase activation

Romaric Nzoumbou Boko¹, Géraldine De Muylder², Stéphanie Matrat³, Mariette Dethoua¹, Philippe Holzmüller¹, Sylvie Daulouède¹, Laurence Lecordier², Silla Semballa¹, Vincent Pitard⁴, Pierrette Courtois¹, Pierrick Uzureau², Alain Beschin^{2, 5, 6}, Etienne Pays², Philippe Vincendeau¹

1. Laboratoire de Parasitologie, UMR 177 IRD CIRAD Université de Bordeaux, BP43, 33076 Bordeaux, France

2. Laboratory of Molecular Parasitology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

3. UR454, INRA, Centre de Clermont-Ferrand/Theix, France

4. Laboratoire d'Immunologie, Université de Bordeaux, France

5. Myeloid Cell Immunology Laboratory, VIB Brussels, Belgium

6. Cellular and Molecular Immunology Unit, Vrije Universiteit Brussel (VUB), B-1050 Brussels, Belgium

Corresponding author: Philippe Vincendeau,
philippe.vincendeau@u-bordeaux2.fr

Introduction

Parasites have elaborated various strategies to escape the immune response and to take advantage of host growth factors. In particular, parasites need to reduce production of the numerous toxic molecules synthesized by the immune system, including nitric oxide (NO) and its derivatives (Green *et al.*, 1990;; Vincendeau and Daulouede, 1991). Inflammation induced by pathogens is linked to “classical” activation of macrophages including inducible NO synthase (iNOS) activity that triggers NO synthesis from L-arginine (Bogdan, 2001). In trypanosomiasis, alternative activation of macrophages, characterized by induction of arginase activity (Mantovani *et al.*, 2013), has also been evidenced. Arginase hydrolyses L-arginine to L-ornithine and urea, decreasing the intracellular pool of L-arginine, thus also reducing NO production by iNOS. L-ornithine is a precursor for the synthesis of polyamines and favours trypanosome growth (Gobert *et al.*, 2000; Vincendeau *et al.*, 2003). Thus, increased arginase activity is likely to counteract the host immune response and favour parasite growth.

In experimental murine models of infection by trypanosomes of the *brucei* group, agents of human and animal trypanosomiasis, macrophage host arginase is induced and represents a marker of resistance/susceptibility to infection (Gobert *et al.*, 2000; Duleu *et al.*, 2003). The steps leading to arginase induction was investigated in a trypanosomiasis caused by *Trypanosoma musculi*, a natural mouse extracellular protozoan. Such a self-limiting infection provides a natural model of reciprocal interactions in which communications can establish and endure between host and pathogen. Infection by *T. musculi* lasts 20-25 days comprising a growth phase, a plateau phase and an elimination phase. While elimination of parasites requires antibodies and macrophages, the mechanisms controlling development and proliferation remain unknown (Viens *et al.*, 1974; Vincendeau *et al.*, 1981; Vincendeau *et al.*, 1986).

In this study, the induction of arginase by *T. musculi* and soluble factors excreted/secreted by parasites was analyzed both *in vivo* and *in vitro*. This induction favours parasite growth, as a monoclonal antibody directed to arginase-inducing factor inhibited *T. musculi* growth *in vitro* and *in vivo*. Induction of arginase activity involves mannose receptors, as mannose injection decreased arginase induction and parasite load *in vitro* and *in vivo*, and the parasite load was reduced in MR KO mice.

Materials and Methods

Reagents

D (+) Mannose, D (+) galactose, S-(2-boronoethyl)-L-cysteine (BEC), L-arginine, L-ornithine, antiprotease inhibitors cocktail, α -isonitrosopropiophenone, Triton X-100, urea, Trishydroxymethylaminomethane (Tris), MnCl_2 (Sigma Chemical Co., Louis, USA); TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); FITC anti-mouse CD206 (Biolegend*) and APC-rat anti-mouse CD14 (BD Biosciences*).

Parasites

Trypanosoma musculi (strain Partinico II) was originally obtained from The London School of Hygiene and Tropical Medicine (Krampitz *et al.*, 1969). Parasites were maintained in liquid nitrogen or maintained *in vivo* by passage in normal Swiss mice by a peritoneal injection (5×10^4 parasites per mouse). Parasites were purified from blood by chromatography on DEAE cellulose (Lanham, 1968).

Mice

Female Swiss mice (8 to 12 wk old) were obtained from Charles River (Saint-Germain-sur-l'Arbresle, France). WT B6 mice and Mrc1 KO B6 were bred in the Laboratory of Molecular Parasitology of Université libre de Bruxelles.

Experiments, maintenance and care of mice complied with guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (CETS n°123). Experiments were approved by the Department for the protection of animals and plants of the Préfecture de la Gironde (Identification number A33-063-324).

Parasite excreted secreted factors

Soluble parasite excreted/secreted factors (ESF) were prepared in a secretion medium according to a method previously described (Holzmüller *et al.*, 2008). Purified parasites ($2 \times 10^8/\text{ml}$) were incubated in medium for 2 hours at 37°C . Parasite viability was assessed at first by microscopic examination and secondly by flow cytometry after Propidium Iodide

staining. Supernatant containing ESF was separated from trypanosomes by centrifugation (1,000g, 10 min, 4°C) and filtered using a 0.22 µm low-binding protein filter.

Peritoneal macrophage cultures

Peritoneal macrophages (10^5 /well) were cultured in 96 well plates in RPMI medium supplemented with 2% FBS, 20 mM HEPES, 2 mM sodium pyruvate, 10 µg/ml gentamicin, and 3% glucose, at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere as previously described (Gobert *et al.*, 2000). At the beginning of the culture, viability, determined by trypan blue dye exclusion, was greater than 98% and purity determined by May Grünwald Giemsa, and non-specific esterase staining showed that more than 96% of the cells were macrophages.

The culture medium of macrophages was removed and replaced with fresh medium 48 hours after. This macrophage conditioned medium (MCM) and medium alone, set in the same conditions but not exposed to macrophages (control medium), were collected, centrifuged at 1000g for 5 min, before use.

Macrophage-parasite co-cultures

Macrophages from control mice were cocultured with purified *T. musculi* (400 added/well) in culture medium. Parasites were counted after 3 days of co-culture. Macrophages were also cultured in presence of ESF, BEC, mannose, galactose, L-ornithine, 2C12 monoclonal antibody or control IgG2b, were added in culture medium when required.

Determination of arginase activity

Arginase activity was evaluated in macrophage cultured for 48 hours with *T. musculi* or ESF or in *ex vivo* macrophages from uninfected mice or from mice at days 7, 10, 15, 20 and 24 post-infection (Corraliza *et al.*, 1994). Briefly, 10^5 cells were treated with 50 µl of lysis solution containing 0,1% Triton X-100-0,01% pepstatin-0.01% aprotinin-0,01% antipain. This mixture was stirred for 30 min in 4°C and then 50 µl of 10 mM MnCl₂ with 50 mM Tris-HCl we added to activate the enzyme for 15 min at 56 °C. L-arginine hydrolysis was initiated by the addition of 25 µl of 0.5 M L-arginine, pH 9.7, at 37 °C for 90 min. The reaction was stopped with a 400 µl mixture of acids, after the addition of 25 µl of α-isonitrosopropiophenone (dissolved in 100% ethanol) followed by heating at 95 °C for 45 min. The coloured product was quantified by absorption at 540 nm, the urea concentration is determined using a calibration curve.

Semi-quantitative Real-Time PCR for arginase mRNA

Mouse peritoneal macrophages were plated in 60-mm dishes at a density of 2×10^6 cells per dish. Total RNA was extracted using TRIzol reagent according to the manufacturer's protocol for the isolation of total RNA from animal cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and converted into cDNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit from 2 μ g total RNA, according to the manufacturer's instructions. Amplification of specific arginase 1 and 2 PCR products was detected using the FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche, Basel, Switzerland). Subsequently, the polymerase reactions were performed using the ABI Prism 7900HT (ABI, New York, NY, USA). Fold differences in gene expression were calculated as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ using β -actin as the housekeeping gene (Duleu *et al.*, 2004).

Flow cytometry

Peritoneal cells from *T. musculi* infected mice were collected at 13 days post infection. Peritoneal cells from non-infected mice were used as control. Cells (10^6 /ml) were incubated with APC-rat anti-mouse CD14 and FITC-anti-mouse CD206. After 20 min, cells were washed and taken up in PBS containing 0.5% FCS. Cells were analysed by flow cytometry (BD FACSCanto and FACSDiva Software, version: 6.1.2).

Results

Time course of arginase activity and mRNA expression in peritoneal macrophages from *T. musculi*-infected mice

Arginase activity was measured in macrophages from infected mice at different days post infection. Day 0 represented arginase activity of macrophages from uninfected mice (control macrophages). This activity peaked at day 13 and correlated to the number of circulating parasites (parasitemia) (Fig.1A).

mRNA levels of arginase 1 and arginase 2 in peritoneal macrophages were determined by RT-PCR and real-time PCR. The up-regulation of arginase 1 was ~ 6 fold more important in macrophages from day 13-infected mice compared to control macrophages (Fig.1B), whereas the gene expression of arginase 2 was not different between control and infected mice (data not shown).

Arginase induction by parasites and parasite excreted/secreted factors (ESF)

Arginase activity was investigated in macrophages from non infected mice co-cultured with parasites. An increase in arginase activity was measured 72 hours later (Fig. 2). Parasites, separated from macrophages by adding an insert into culture well, were as potent arginase inducers as unseparated parasites-macrophages. Moreover, ESF from *T. musculi*, but not secretion medium alone, induces arginase expression (Fig 2), Therefore, *T. musculi* releases factors able to trigger arginase activation in macrophages.

Arginase induction promotes parasite growth

Parasite growth was observed in parasite-macrophage co-cultures and in purified parasites cultured in MCM whereas control medium had slight effect (Fig. 3). Addition of an arginase inhibitor (BEC) to the co-culture dramatically reduced parasite growth. Addition of BEC to MCM just prior to addition to purified parasites had no effect on parasite growth, indicating that BEC had no direct effect on the parasites (Fig 3).

Arginase induction and parasite growth were blocked by anti-TbKHC1 antibodies

A monoclonal antibody (2C12) directed to TbKHC1, the kinesin heavy chain isoform of *T. brucei*, was added to parasite-macrophage co-cultures. A marked decrease in arginase

induction and parasite growth was measured in comparison with parasite-macrophage co-cultures supplemented with control IgG2b or medium alone (Fig. 4A).

Mice treatment with anti-TbKHC1 reduces parasite load

Anti-TbKHC1 or control antibodies were injected intraperitoneally into mice at day 2 post-*T. musculi* infection. The number of circulating parasites was measured daily. Compared to control (saline), 2C12 decreased dramatically the parasite load of infected mice, whereas control IgG2b has no effect (Fig. 4B).

Involvement of a mannose-binding receptor in both arginase induction and parasite growth promotion

Mannose or galactose was added into parasite-macrophage co-cultures or ESF activated macrophage cultures. Mannose had a higher inhibitory effect on parasite or ESF-induced arginase activity than galactose (Fig 5A). Moreover, parasites growth when co-cultured with macrophages was inhibited by mannose whereas galactose had no effect (Fig 5B). Addition of mannose or galactose to MCM just prior to addition to purified parasite cultures had no effect on parasite growth indicating the absence of a direct trypanotoxic effect of sugars (Fig. 5C).

Involvement of mannose receptors in *T. musculi* infection

In peritoneal CD14⁺ macrophages from 14 day-infected mice, the level of CD206 (mannose receptor, Mrc1) expression was increased fourfold compared to control macrophages, suggesting the involvement of this receptor in parasite infection (Fig. 7). In keeping with this finding, intraperitoneal injection of mannose dramatically decreased the parasite load of infected mice, whereas galactose had a less pronounced effect (Fig. 8A). Moreover, mannose and galactose decreased *ex vivo* arginase activity induced by the parasites at day 13 post infection (Fig. 8B). Finally, in Mrc1 KO mice, *T. musculi* parasitaemia was reduced 10 times as compared with infection in WT mice (Fig. 9). Therefore, it appears that mannose receptors are involved in the parasite-mediated induction of arginase activity and parasite growth promotion.

Discussion

In this study we report that *T. musculi* and parasite excreted/secreted factors induce macrophage arginase through a pathway involving mannose-binding receptor(s), resulting in promotion of parasite growth.

Arginase induction is critical for parasite growth. Arginase competes with NO synthase and, by depleting L-arginine, decreases the production of antimicrobial NO and related compounds. More interestingly, arginase favours polyamine production (Vincendeau *et al.*, 2003). Arginase induction is a characteristic feature of macrophage alternative activation (Mantovani *et al.*, 2013). Macrophages have been widely used as feeder layer cells to favour mammalian and parasite cell proliferation *in vitro*. Moreover, macrophage conditioned medium (MCM) has been previously used to favour parasite growth *in vitro* (Albright and Albright, 1980; Vincendeau *et al.*, 1986). Addition of an arginase inhibitor, devoid of direct effect on trypanosomes, to MCM preparation, decreased its parasite growth promoting activity, which was restored by L-ornithine supplementation, although the various components of fetal calf serum might act on synergy. The essential requirement of L-ornithine for the trypanosome is probably linked to its polyamine and trypanothione synthesis, essential for parasite survival, growth, and differentiation (Fairlamb and Cerami, 1992). Di-fluoro methyl ornithine, a structural analogue of L-ornithine, is used alone or, more recently, in combination with nifurtimox, as an effective drug in human African trypanosomiasis (HAT) provoked by *T. b. gambiense* and *T. b. rhodesiense* (Priotto *et al.*, 2009). However, its administration is difficult and needs large quantities of intravenously injected fluids, which limits its use in remote areas. So, easier ways to target polyamine synthesis would be beneficial for therapeutic approaches.

The molecules involved in this parasite growth promoting pathway were investigated. Macrophage arginase induction by ESF was inhibited by a monoclonal antibody 2C12. This antibody was used to screen a cDNA *T. b. gambiense* expression library, resulting in the identification of the *T. b. gambiense* arginase-inducing protein TbKHC1, an orphan member of the kinesin heavy chain family (De Muylder *et al.*, 2013). We provide here evidence that 2C12 inhibited arginase-inducing activity of ESF from *T. musculi*, the natural parasite of mice, suggesting that arginase induction is a conserved escape mechanism devised by

trypanosomes. Injection of 2C12 into infected mice dramatically reduced parasite load, confirming the growth-promoting effect of arginase induction. Parasites excreted/secreted factors contain structures bearing carbohydrates, potential ligands for macrophage membrane receptors (Martinez-Pomares, 2012). Mannose inhibited arginase induction and parasite growth in macrophage-trypanosome cocultures and in infected mice. This supports the involvement of a mannose binding receptor in triggering this induction. In support of this view, parasitaemia was considerably reduced in Mrc1 KO mice. As galactose decreased also parasite load, the role of Mrc1, and possibly of other mannose receptors of myeloid cells such as galactose receptors, SIGN-R1 requires further investigations. The interaction with others receptors might also be involved. Furthermore, besides its parasite growth controlling effect, mannose might also act by its anti-inflammatory properties (Korneeva *et al.*, 2012), which might be very interesting in inflammatory diseases such as trypanosomiasis, in which cachexia and high levels of plasmatic TNF- α are predominant features.

During co-evolution within their hosts, trypanosomes have conserved a mechanism favouring their multiplication and diverting host immune response. They synthesise/excrete an arginase inducing factor acting on the mannose receptor. Inhibitors of the pathway leading to arginase induction reduce parasite load in infected mice, suggesting the interest of interference strategies to control trypanosomiasis. The role of arginase induction joined to others mechanisms such as the presence of receptors for the Fc region of immunoglobulins on trypanosome surface might be essential to escape immune defences (Vincendeau et Daëron, 1989).

References

- Albright, J.W., and J.F. Albright. 1980. *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi* in cell free medium conditioned by rodent macrophages and mercaptoethanol. *Int. J. Parasitol.*10:137.
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.*2:907-16.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M (1994) Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231-235.
- Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, et *al.* (2004) Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J Immunol* 172: 6298-6303.
- Fairlamb AH, Cerami A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol.*46:695-729.
- De Muylder G, Daulouède S, Lecordier L, Uzureau P, Morias Y, Van Den Abbeele J, Caljon G, Hérin M, Holzmüller P, Semballa S, Courtois P, Vanhamme L, Stijlemans B, De Baetselier P, Barrett MP, Barlow JL, McKenzie ANJ, Barron L, Wynn TA, Beschin A, Vincendeau P, Pays E. (2013) A *Trypanosoma brucei* kinesin heavy chain promotes parasite growth by triggering host arginase activity. *Plos Pathogens*, (in press).
- Gobert AP, Daulouède S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, et *al.* (2000) L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun* 68: 4653-4657.
- Green, S.J., M.S. Meltzer, J.B. Hibbs, Jr., and C.A. Nacy. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144:278-283
- Holzmüller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Gonçalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V. (2008) 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.*(1):79-86.
- Korneeva OS, Cheremushkina IV, Glushchenko AS, Mikhaïlova NA, Baturo AP, Romanenko ÉE, Zlygostev SA.(2012) Prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* (5):67-70.
- Krampitz, H.E. 1969. Verbreitung wirt-parasit-beziehungen und vermehrung sizilianischer stämme von *Trypanosoma (Herpetosoma) duttoni* Thiroux 1905 (Protozoa, Trypanosomatidae). *Z. Parasitenkd.* 32:297.
- Lanham SM. (1968) Separation of trypanosomes from the blood of infected rats and mice by anion-exchangers. *Nature.* 218(5148):1273-4.
- Largent, B. L., Walton, K. M., Hoppe, C. A., Lee, Y. C., and Schnaar, R. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1764–1769.

Iyer SP, Akimoto Y, Hart GW.(2003) Identification and cloning of a novel family of coiled-coil domain proteins that interact with O-GlcNAc transferase. J Biol Chem. 278(7):5399-409.
Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M.(2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. J. Pathol. 229(2):176-85.

Martinez-Pomares L. (2012) The mannose receptor. J Leukoc Biol. 92(6):1177-86.

Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V.(2009)Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. Lancet. 374 (9683):56-64.

Shepherd, V. L., Lee, Y. C., Schlesinger, P. H., and Stahl, P. D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1019–1022.

Viens, P., G.A.T. Targett, R. Leuchars, and A.J.S. Davies. (1974). The immunological response of CBA mice to *Trypanosoma musculi*. I. Initial control of the infection and the effect of T cell deprivation. Clin. Exp. Immunol. 16:279.

Vincendeau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD. (2003) Arginases in parasitic diseases.Trends Parasitol. 19(1):9-12.

Vincendeau, P., A. Caristan, and R. Pautrizel. 1981. Macrophage functions during *Trypanosoma musculi* infection in mice. Infect. Immun. 34: 378.

Vincendeau, P., M. Daëron, and S. Daulouède. 1986. Identification of antibody classes and Fc receptors responsible for phagocytosis of *Trypanosoma musculi* by mouse macrophages. Infect. Immun. 53:600.

Vincendeau, P., B. Guillemain, S. Daulou
1985. ~~and~~ *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi*: requirements of cells and serum-free culture medium. Int. J. Parasitol. 16:387.

Vincendeau, P., and M. Da'ron.(1989). *Trypanosoma musculi* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE, and IgG subclasses. J. Immunol. 142:1702.

Legends to figures

Figure 1A: Kinetics of arginase activity and parasitemia in infected mice

Parasitemia and arginase activity were assessed at day 7, 10, 15, 20 and 24 post-infection. Day 0 represents values of control mice. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 6 mice.

Figure 1B: Arginase mRNA expression in infected mice versus control mice

mRNA arginase I, we determined in peritoneal macrophages at day 13 post infection. Arginase I level was 6 fold more important in macrophages from infection mice versus macrophages controls.

Figure 2: *In vitro* arginase activity induced by parasites and ESF

Arginase activity was evaluated in macrophages co-cultured with parasites in contact or separated by an insert, and with ESF (10 μ g/ml) for 72 hours. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 6 culture wells.

Figure 3: Parasite growth in MCM and BEC

Parasite growth observed 72 hours later in parasite-macrophage cocultures, in culture medium alone (MA) in MCM, in MCM supplemented with BEC, an arginase inhibitor, during macrophage culture or just before addition to purified parasites. Each result is the mean $\pm$ standard deviation from 6 culture wells.

Figure 4 A: Effect of Anti-TbKHC1 on *in vitro* parasite proliferation

Parasite growth observed 72 hours later in parasite-macrophage co-cultures containing medium alone or supplemented with 2C12 or IgG2b (10 μ g/ml). Each point is the mean + standard deviation from 6 culture wells.

Figure 4 B: Effect of Anti-TbKHC1 on parasite induced arginase activity *in vitro*

Macrophages were cultured for 72 hours in culture medium, in medium containing parasites, in medium containing parasites and supplemented with 2C12 or IgG2b (10 μ g/ml). Each point is the mean + standard deviation from 6 culture wells.

Figure 5A: *In vitro* inhibition of parasite- and ESF-arginase induction by sugars

Macrophages were cultured for 72 hours in culture medium, in medium containing parasites or ESF, in medium containing parasites or ESF and supplemented with mannose or galactose (10mM). Each point is the mean + standard deviation from 6 culture wells.

Figure 5B: Effect of sugars on *in vitro* parasite proliferation in co-cultures

Parasite growth observed 72 hours later in parasite-macrophage cocultures containing mannose or galactose (10mM)). Each point is the mean + standard deviation from 6 culture wells.

Figure 5C: Effect of sugars on *in vitro* parasite proliferation in MCM

Parasite growth observed 72 hours later in purified parasite culture in MCM. Mc+CM was supplemented with mannose or galactose (10mM)) just prior to addition to purified parasites. Each point is the mean + standard deviation from 6 culture wells.

Figure 6: Effect of Anti-TbKHC1 or control antibodies on parasitemia

Parasitemia was assessed post-infection in mice having received saline, 2C12, or IgG2b (200µg/mouse) two days post-infection. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 8 mice.

Figure 7: Mannose receptor expression in peritoneal macrophages from control and *T. musculi*-infected mice. Peritoneal cells (10^6 /ml) from 14 day-infected mice and non-infected mice were labelled with APC-rat anti-mouse CD14 and FITC-anti-mouse CD206. (n=4)

Figure 8A: Effect of sugars on parasitemia

Parasitemia was assessed post-infection in mice receiving intraperitoneal injections of saline, mannose or galactose three times /day from day 1 post-infection. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 6 mice.

Figure 8 B: Inhibition of *ex vivo* macrophage arginase activity by sugars

Arginase activity was assessed at day 13 post-infection in macrophages from mice receiving intraperitoneal injections of saline, mannose or galactose twice a day from day 1 post-infection. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 6 mice.

Figure 9: Parasitemias in Mrc1 KO and WT mice

Parasitemia was assessed post-infection in MrC1 KO and WT mice. Each point is the mean $\pm$ standard deviation from 6 mice.

Figures

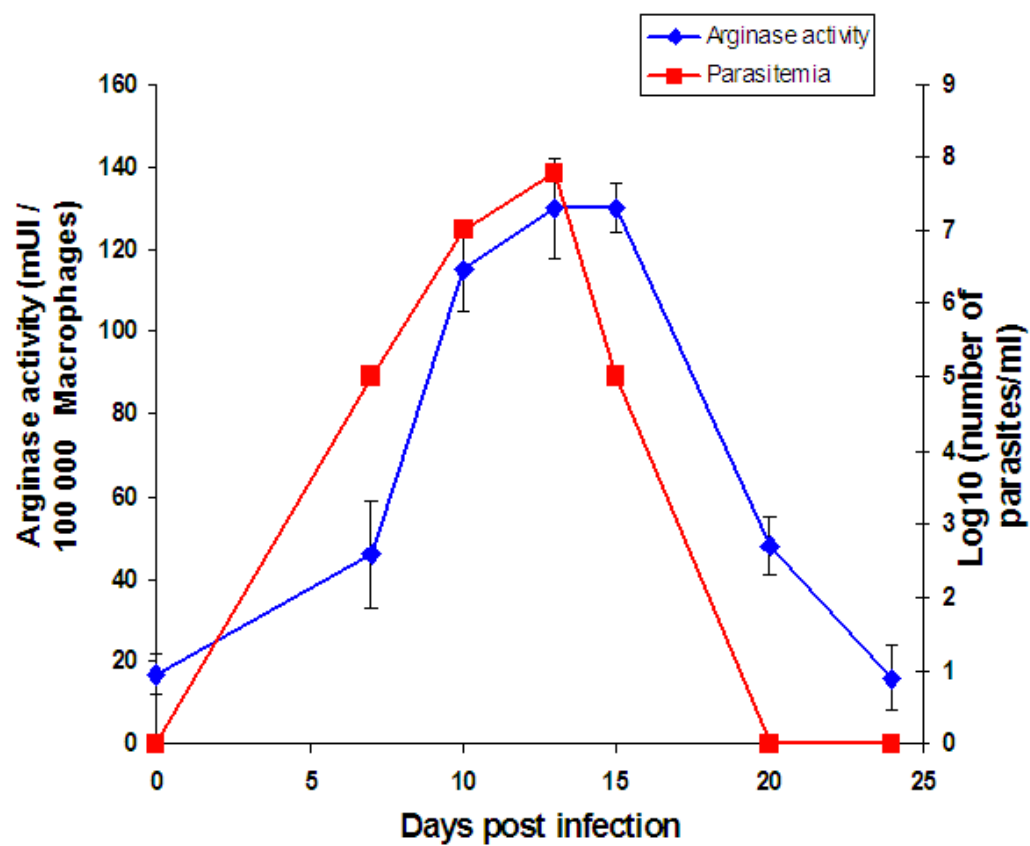


Figure 1A: kinetics of arginase activity and parasitemia in infected mice

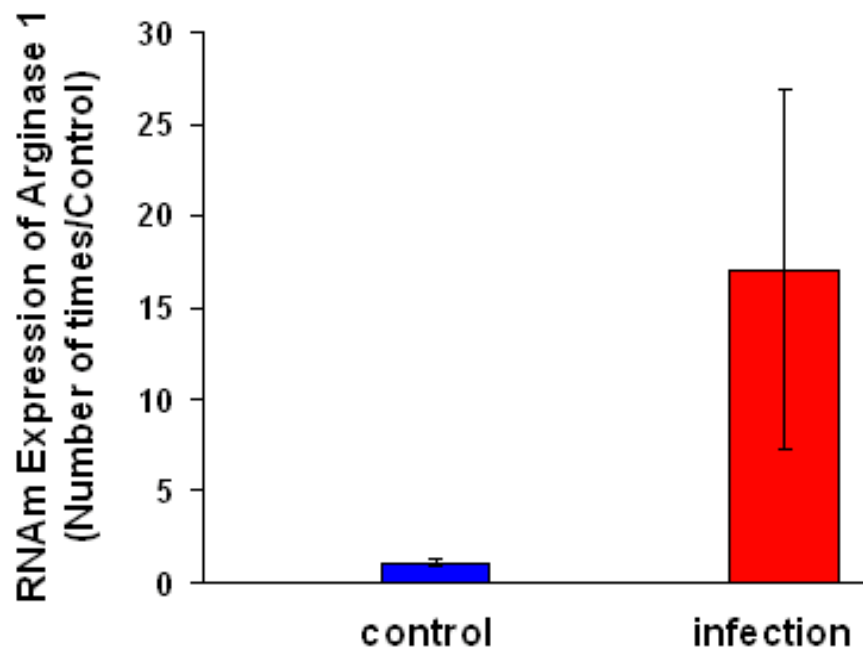


Figure 1B: Arginase mRNA expression in infected mice versus control mice

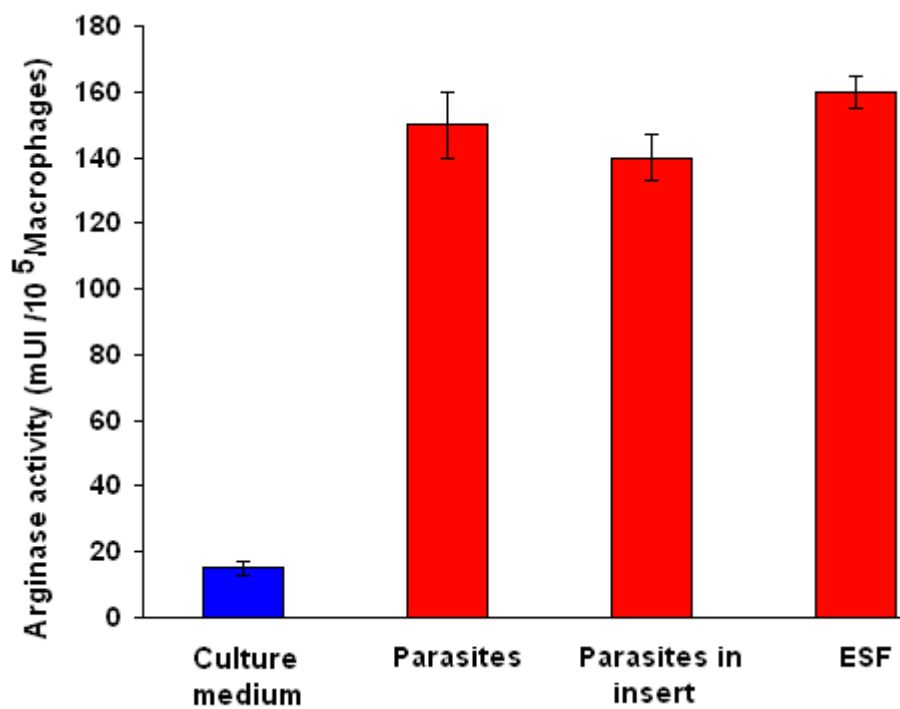


Figure 2: *In vitro* arginase activity induced by parasites and ESF

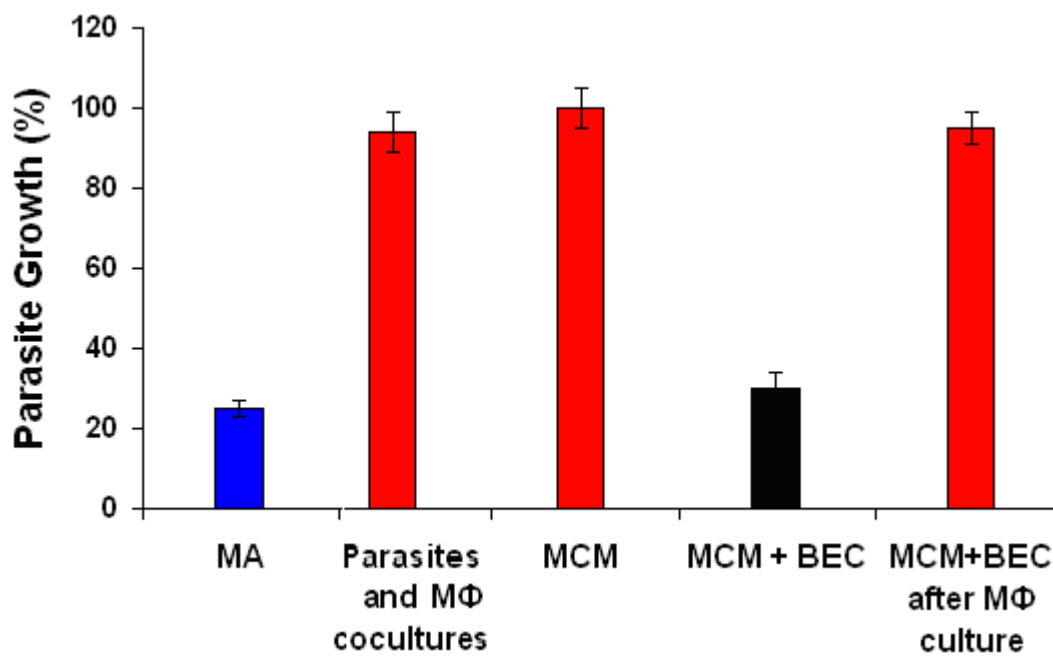


Figure 3: Parasite growth in MCM and BEC

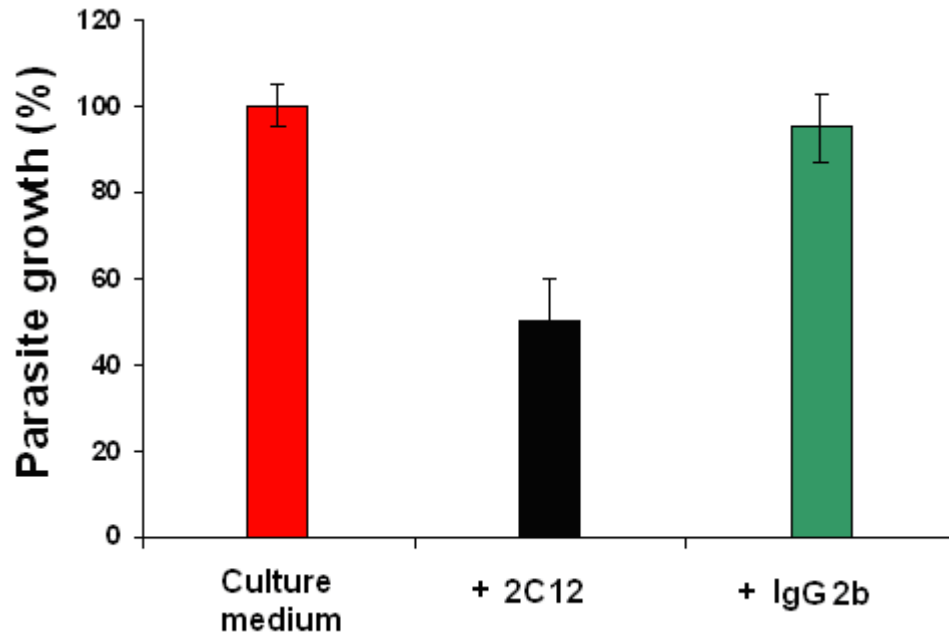


Figure 4 A: Effect of 2C12 on *in vitro* parasite growth

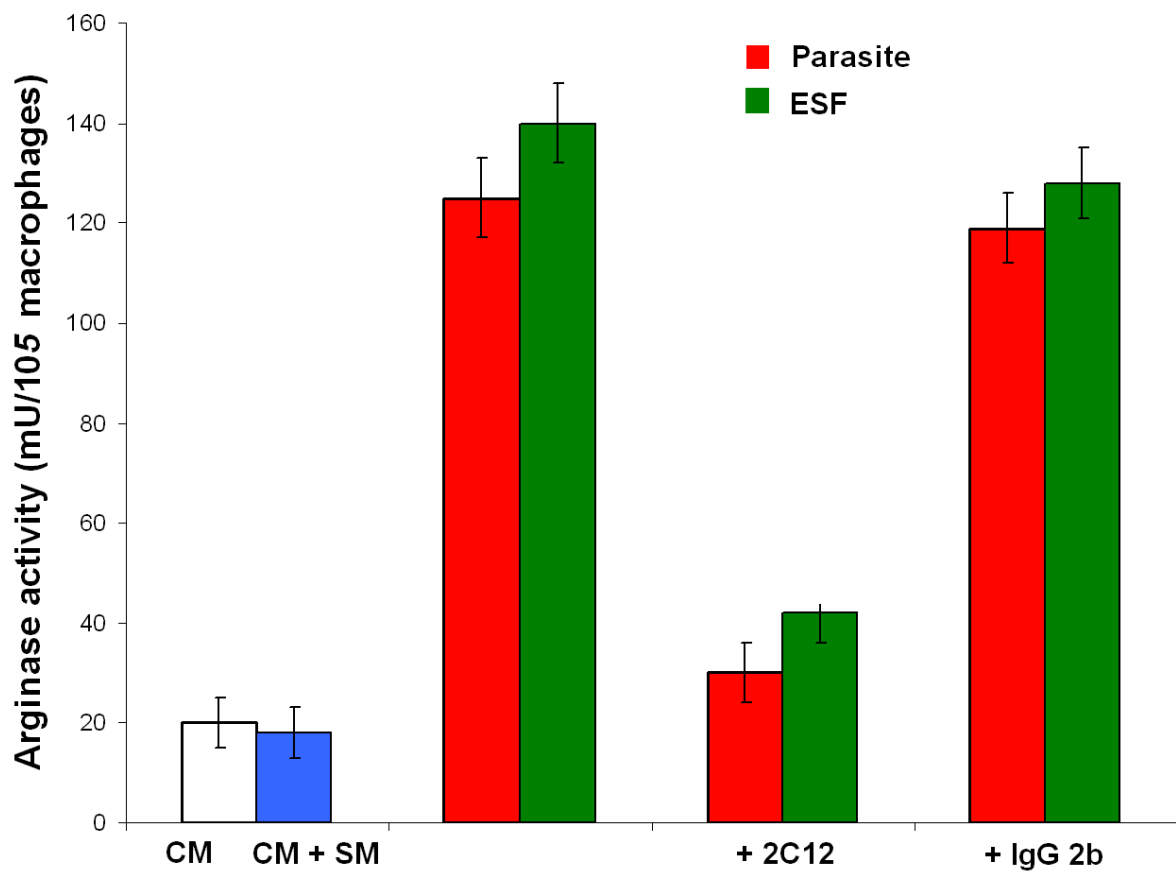


Figure 4 B: effect of 2C12 on parasite- and ESF-induced arginase activity *in vitro*

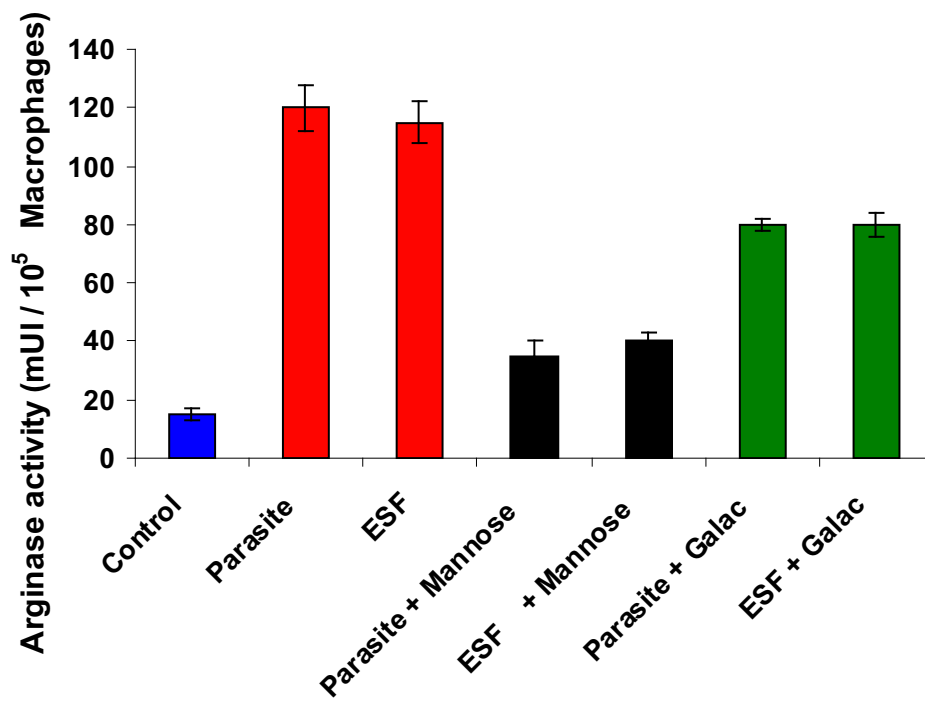


Figure 5A: *In vitro* inhibition of arginase induction by sugars

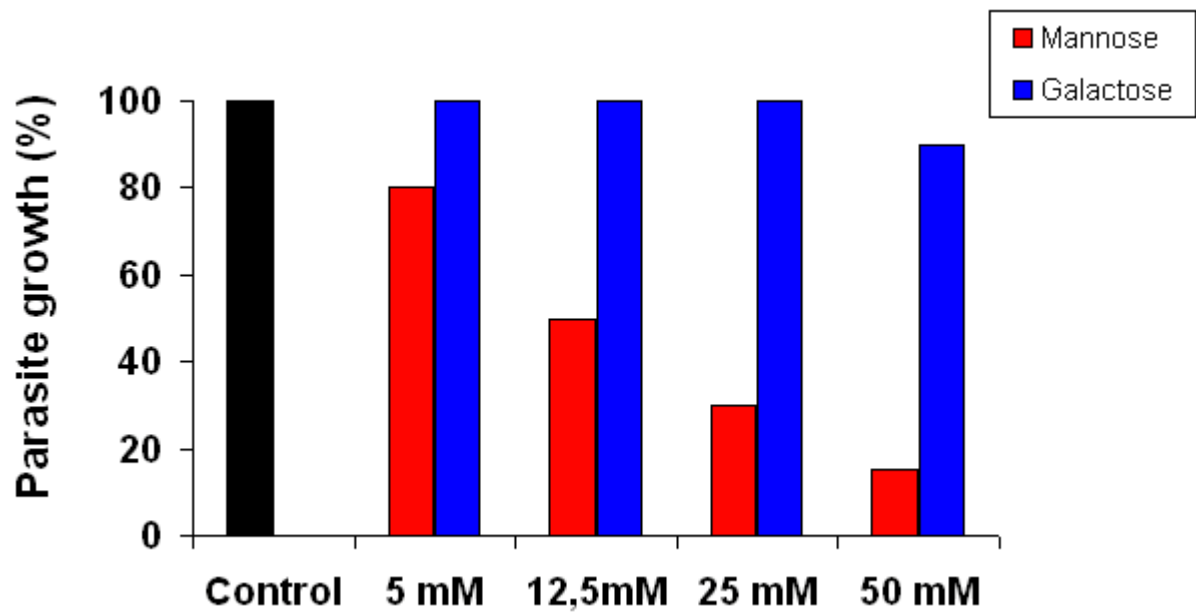


Figure 5B: Growth of parasites cultured in the presence of mannose or galactose

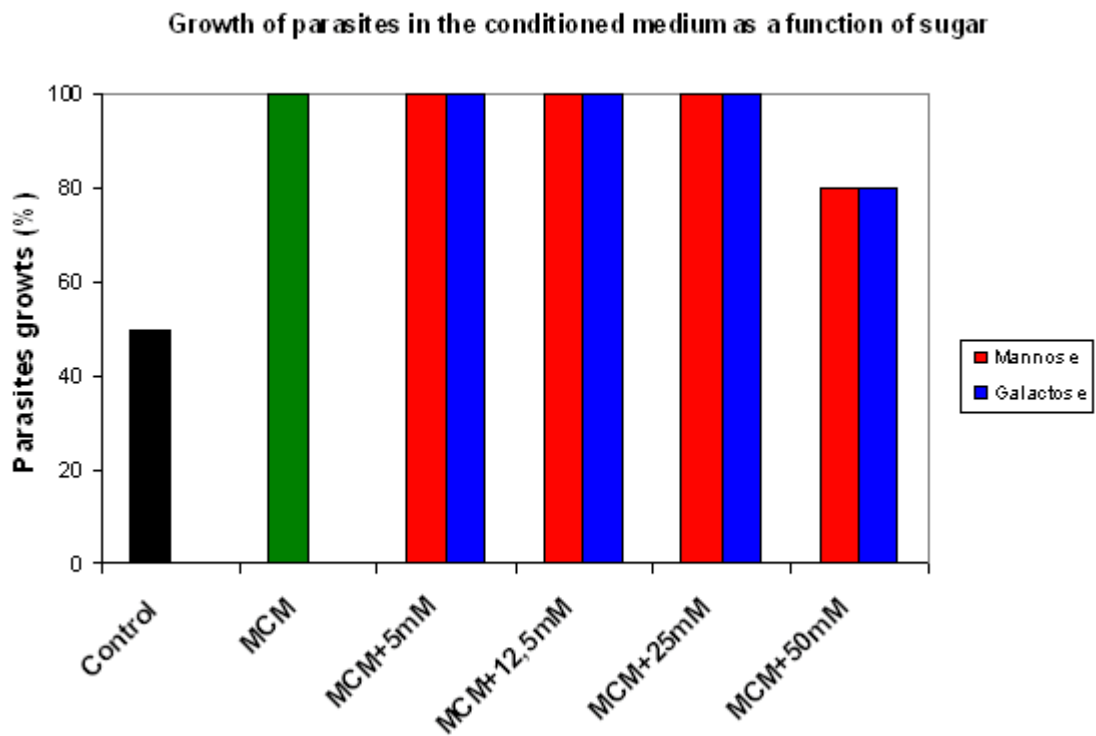


Figure 5C: Growth of parasites in MCM and sugars

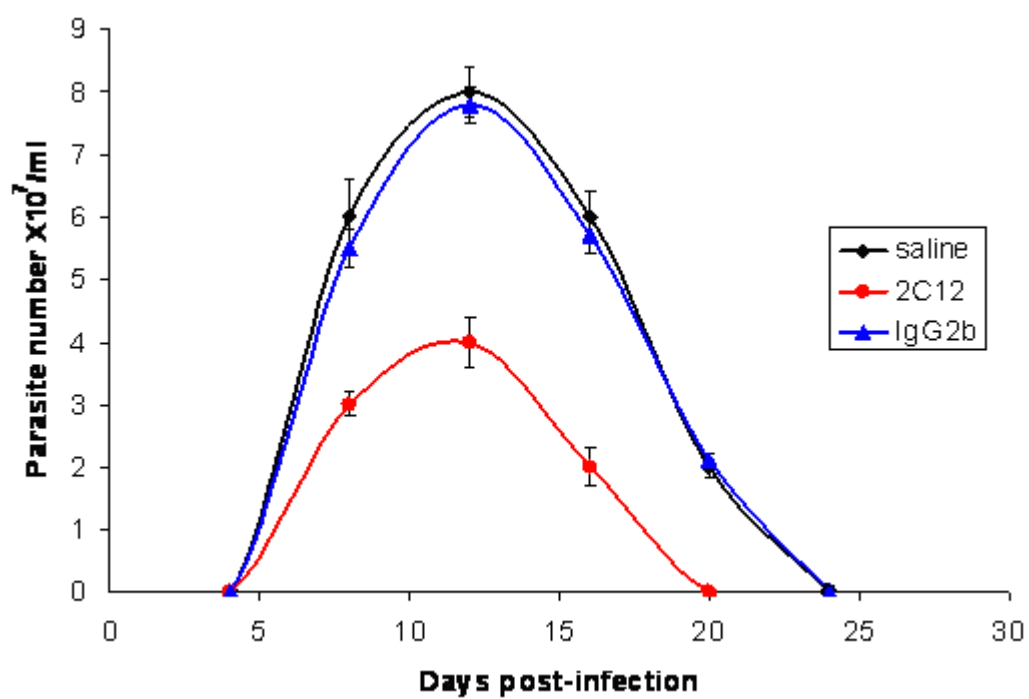
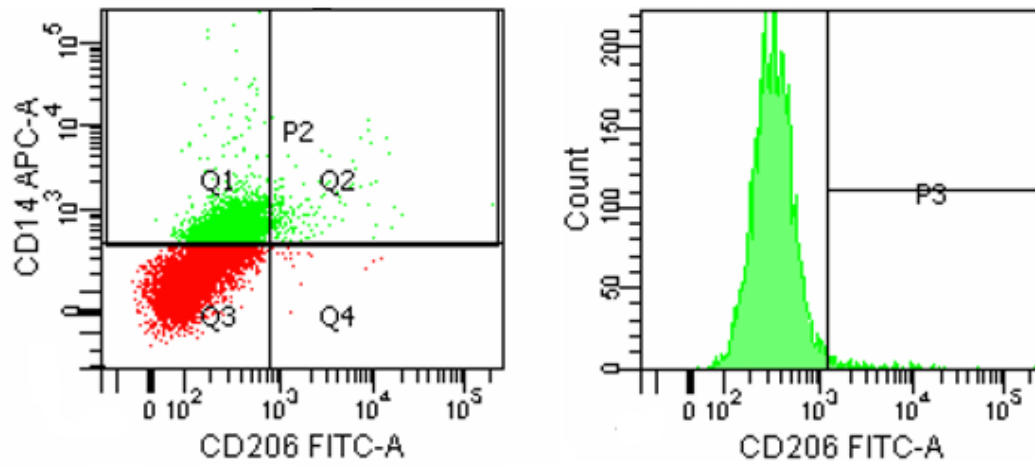
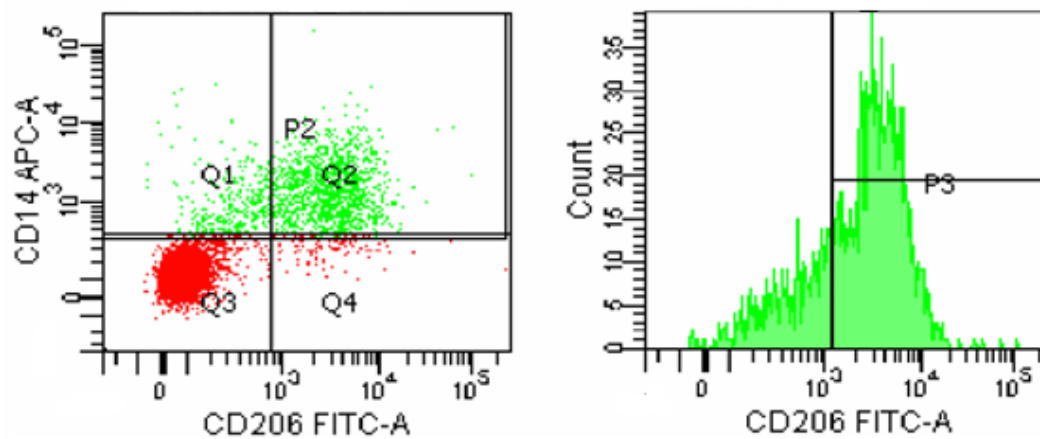


Figure 6: Effect of 2C12 on parasitemia



A: control macrophages (n=4)



B: macrophages from *T. musculi*-infected mice (n=4)

Figure 7: mannose receptor expression in macrophages from control and *T. musculi*-infected mice (n=4)

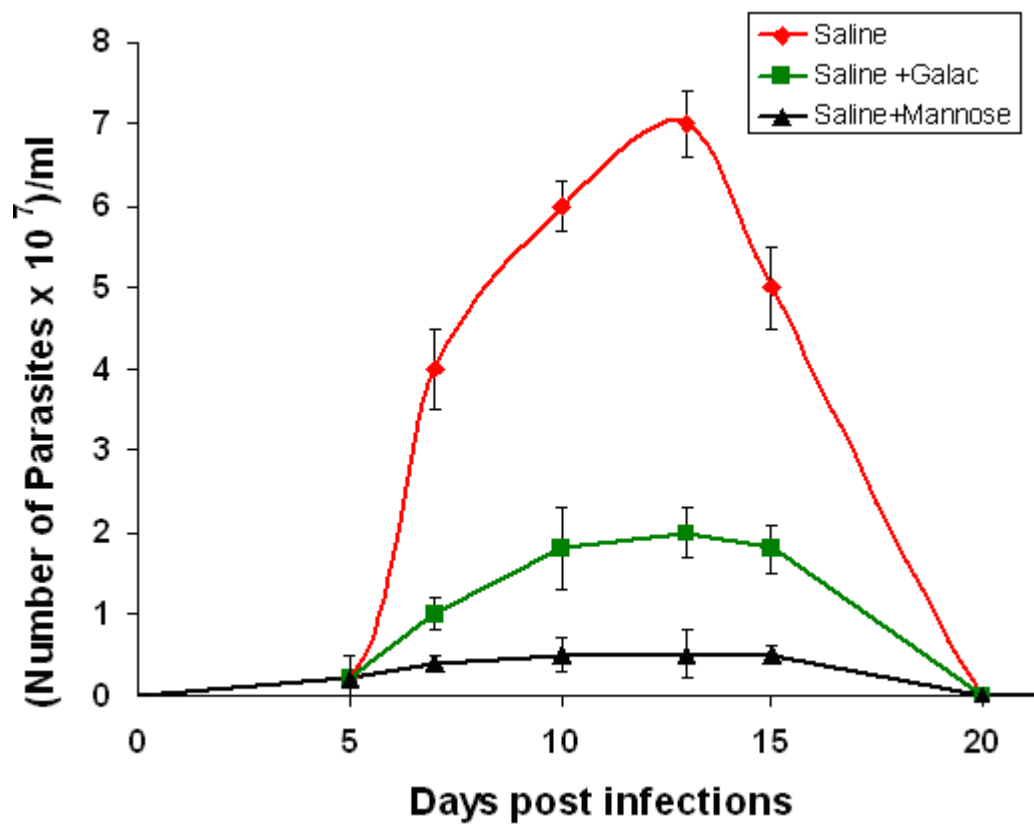


Figure 8 A: Inhibition of the parasite proliferation by sugars

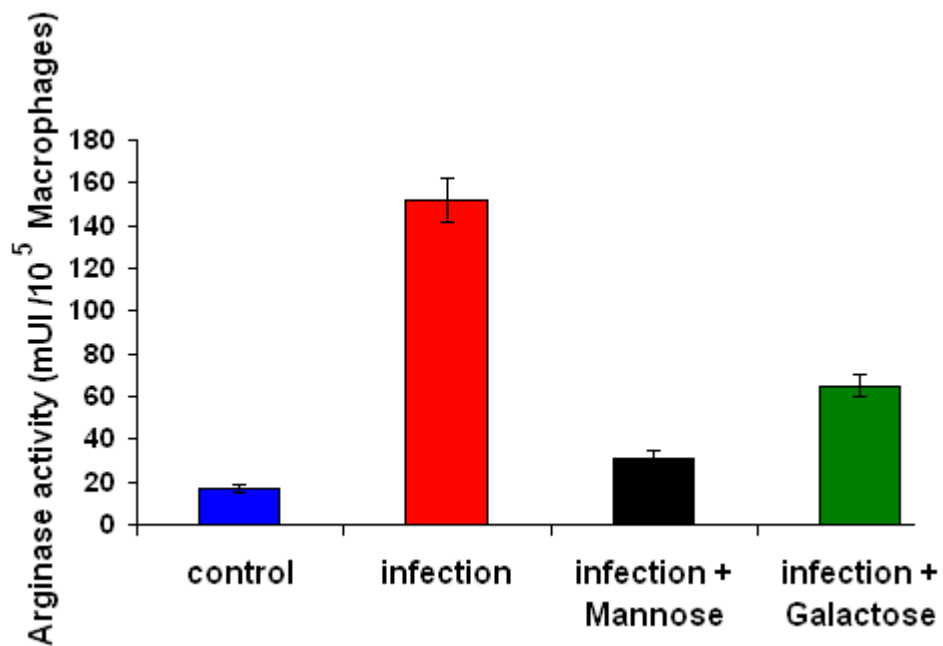


Figure 8 B: Inhibition of *ex vivo* macrophage arginase activity induced at day 13 post infection by sugars

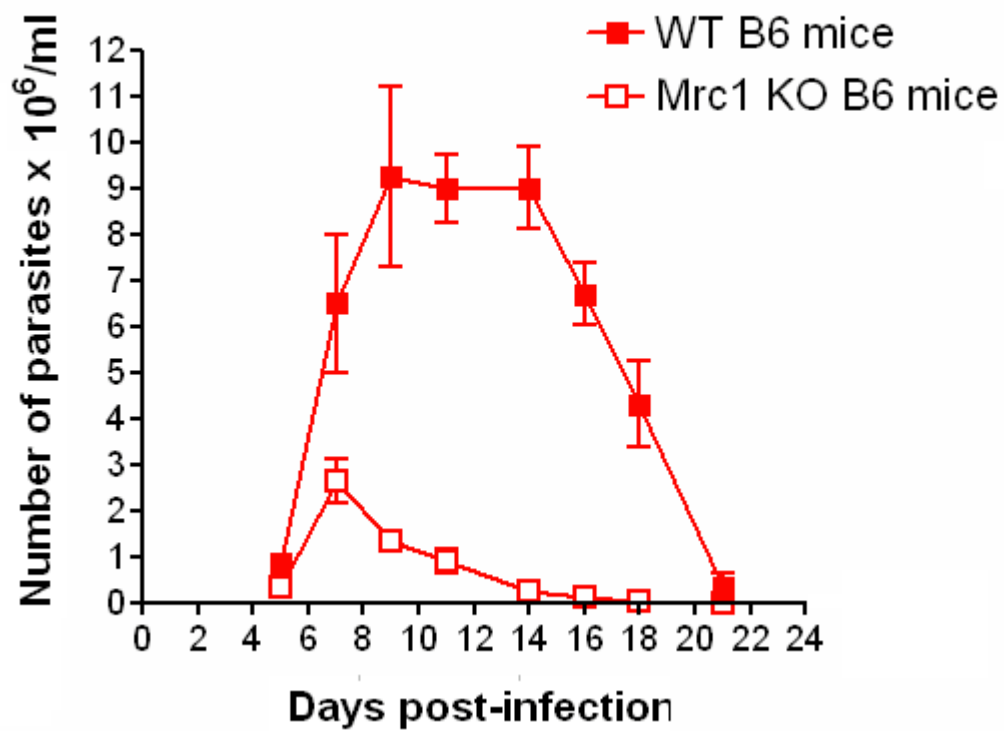


Figure 9 : Parasitemias in Mrc1 KO and WT mice

Poster N° 1

Induction of macrophage arginase by a *Trypanosoma musculi* factor favours infection

Romarc Nzuombou Boko¹, Géraldine De Muylder², Mariette Dethoua¹, Philippe Holzmüller^{1,3}, Sylvie Jaulouède¹, Laurence Lecordier², Pierrette Courtois¹, Pierrick Uzureau², Alain Beschin⁴, Etienne Pays², Philippe Vincendeau¹ philippe.vincendeau@parasito.u-bordeaux2.fr

¹ Laboratoire de Parasitologie, Université de Bordeaux II, BP43, 33076 Bordeaux, France

² Laboratory of Molecular Parasitology, Université Libre de Bruxelles, Gosselies, Belgium

³ UMR 177 IRD-CIRAD Montpellier

⁴ Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, VUB, B-1050, Brussels, Belgium

ABSTRACT

Macrophages are key cells in trypanosomiasis. They synthesize $\text{TNF-}\alpha$, whose persistent production is correlated with disease severity and synthesis of reactive oxygen and nitrogen species. In experimental trypanosomiasis, induction of macrophage arginase precedes NO_2 activation. This leads to depletion of L-arginine, a common substrate of both enzymes, resulting in lower levels of cytotoxic NO_2 and increased production of polyamines that favours parasite growth. Extracellular trypanosomes can modulate the functions of immune cells through soluble excreted/secreted factors (PSF). In experimental murine trypanosomiasis provoked by *Trypanosoma musculi*, PSF induced macrophage arginase *in vivo* and *in peritoneal macrophage culture*. A monoclonal antibody directed against a high molecular weight component of PSF selectively inhibited this arginase induction. Infection of this monoclonal to *T. musculi*-infected mice specifically and dramatically reduced parasite load. In order to evaluate the involvement of glycoproteins in this process, various sugars were added to macrophage-trypanosome co-cultures. Mannose was found to inhibit arginase induction *in vitro*, and injection of mannose to trypanosome-infected mice reduced the parasite load. These data suggest that the arginase pathway of macrophages controls the growth of extracellular parasites such as *T. musculi*. Macrophage receptors that recognize mannose, such as the mannose receptor or SIGIR-1, might be involved in arginase induction. The use of KO mice for these receptors will help in deciphering the role of macrophages in trypanosome infection, and a possible involvement of other immune cells.

Macrophages ($\text{M}\phi$) play a key role in trypanosomiasis. Classically activated $\text{M}\phi$, with immune components (antibodies, complement, cells), are associated with parasite killing. However alternatively activated $\text{M}\phi$ interfere. So, arginase induction leads to a depletion of L-arginine (substrate of NO_2 , resulting in lower levels of cytotoxic NO_2) and increased production of polyamines (necessary for parasite growth and differentiation). In mice infected by *T. musculi*, a natural murine parasite, arginase induction by parasite components was investigated. $\text{M}\phi$ Arginase expression is induced by glycosylated HMW parasite soluble factors. A mAb directed to a member of trypanosome kinesin family specifically inhibits parasite-induced arginase expression. Mannose inhibits parasite-induced arginase expression. Injection of mannose into infected mice reduce parasitemias.

MATERIALS AND METHODS

The *Trypanosoma musculi*, originally obtained from the London School of Hygiene and Tropical Medicine

Parasite Soluble Factors prepared as described (Holzmüller, 2008)

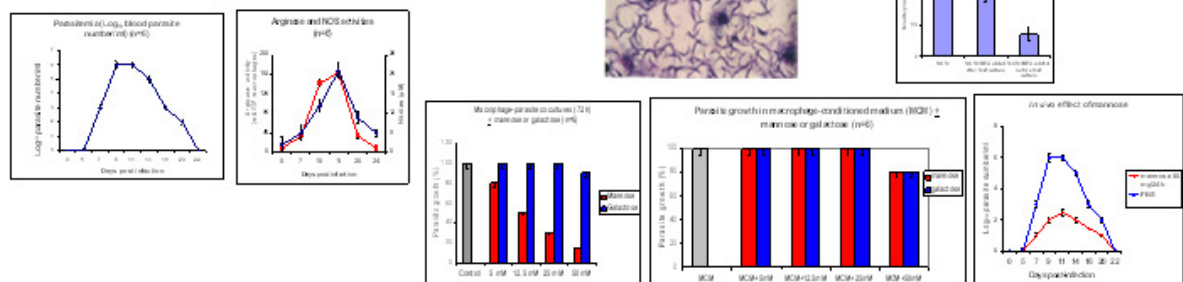
Macrophage cultures and co-cultures with trypanosomes as previously described (Dilek, 2004)

Measurements of Arginase activity according to Corraliza (1994)

Measurements of Nitrite according to Hageman and Reed (1980)

RESULTS

1. Macrophage Arginase and NO_2 Inductions in *T. musculi*-infected mice
2. $\text{M}\phi$ Arginase is induced by parasites and soluble factors (TmSF)
3. A mAb (2C12) directed to a HMW TmSF inhibits induction
4. Arginase expression is required for parasite growth
5. $\text{M}\phi$ receptors for mannose glycosylated TmSF are required for arginase induction
6. Mannose injected into infected mice inhibits parasite growth



CONCLUSIONS

$\text{M}\phi$ arginase expression is induced by parasites to inhibit NO_2 production and to promote polyamine synthesis, essential for parasite growth.

A high molecular weight factor is involved in $\text{M}\phi$ arginase induction and triggers a mannose binding $\text{M}\phi$ receptor.

Injection of mannose into infected mice decreases parasite load.

Use of KO mice and blocking antibodies will help to identify $\text{M}\phi$ mannose binding receptors and the signalling pathways that induce arginase expression and promote cytokine production.

The requirement of others factors and transduction pathway cannot be excluded.

Interference with macrophage receptors might represent a useful approach for therapy strategy in various diseases.

REFERENCES

- Holzmüller P, Gribaut P, Brizard J-P, Berthier G, Charrel L, Bousard G, Bucheton B, Walker F, Chuchane P, Bras-Goncalves R, Lemerle J-L, Vincendeau P, Cuny G, Froese R, Baron DG. "Pathogen-protection" *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2008; 24:66-78.
- Holzmüller P, Baron DG, Courtois P, Kott R, Bras-Goncalves R, Jaulouède S, Selino P, Cuny G, Vincendeau P, Jomann V. Vincendeau P. Pathogen-protection: of *Trypanosoma brucei* infection in the host: differences in host immune response modulation by secreted and excreted factors. *Microbes Infect*. 2008; 10:79-86.

Conclusion et perspectives

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence par des approches complémentaires que le *T. musculi* induit l'activité arginase macrophagique nécessaire à sa prolifération. L'induction de l'activité arginase diminue la production de NO toxique pour *T. musculi*. Le parasite sécrète un facteur soluble qui se fixe sur le récepteur mannose (et éventuellement d'autres récepteurs) à l'origine d'une série d'évènements aboutissant à l'expression et l'induction de l'activité arginase.

- L'inhibition du facteur inducteur par le 2C12 réduit la parasitémie et l'activité arginase.
- L'inhibition du récepteur mannose par le mannose libre réduit également la parasitémie et l'activité arginase.

L'effet du 2C12 sur l'activité arginase induite par *T. musculi* souligne un rapprochement entre le facteur inducteur de ce parasite et celui des parasites du complexe *brucei*.

En perspectives pour cette première partie d'étude, il serait important :

- D'évaluer l'activité arginase dans les souris Mrc1 ;
- D'évaluer l'effet de la co-thérapie mannose et 2C12 ;
- D'identifier le facteur inducteur par spectroscopie de masse.
- D'étudier les différents récepteurs susceptibles d'être impliqués (SIGN R1, TLR) et les voies de signalisation impliquées

Article N° 2

Serum Arginase, a Biomarker of Treatment Efficacy in Human African Trypanosomiasis

Introduction

Au cours de la co-évolution, les parasites ont sélectionné et conservé les mécanismes d'échappement les plus sophistiqués. Dans la première partie de nos résultats, nous avons mis en évidence dans le modèle *T. musculi*, parasite naturel de la souris, l'induction de l'activité arginase macrophagique. Celle-ci lui permet d'échapper à l'effet trypanostatique et trypanocide de NO et de bénéficier du produit de la réaction de l'arginase, l'ornithine, précurseur des polyamines qui favorise la prolifération du trypanosome et entrent dans la constitution du trypanothione, essentiel pour leur défense contre les stress oxydatifs.

Chez les souris parasitées, la prolifération du *T. b. brucei* est accompagnée d'une forte augmentation de l'activité de l'arginase macrophagique et d'une diminution importante du pool de L-arginine sérique (Gobert et al, 2000). La susceptibilité des souris Balb/C par rapport aux souris C57BL/6 est associée à l'activité de l'arginase plus importante dans leurs macrophages péritonéaux (Duleu et al, 2004). En outre, il est montré aussi que la susceptibilité de souris BALB/C au *T. congolense* est due également à l'activité arginase très marquée dans les macrophages péritonéaux des souris BALB/C (Win et al, 2002).

Par ailleurs, dans la THA, on observe une profonde dysrégulation et une modification majeure du système immunitaire. Les réponses immunitaires ne détruisent pas la totalité des parasites et sont également impliquées dans les troubles immunopathologiques.

Nous avons recherché si l'induction de la voie arginase a été conservée par les trypanosomes du groupe *brucei* infectant l'homme. Nous avons d'une part recherché une augmentation de l'activité arginase dans le sérum des patients atteints de THA. L'augmentation de l'activité arginase dans le sérum suggère la conservation de ce mécanisme dans la THA. L'activité arginase se normalise après un traitement efficace. D'autre part nous avons mis en évidence que les *T. b. gambiense* et leur ESF induisent l'activité arginase chez les macrophages murins et les leucocytes humains (résultats préliminaires).

Serum Arginase, a Biomarker of Treatment Efficacy in Human African Trypanosomiasis

Romarc Nzoumbou-Boko,^a Mariette Dethoua,^a Frédéric Gabriel,^b Alain Buguet,^c Raymond Cespuglio,^d Pierrette Courtois,^a Sylvie Daulouède,^a Bernard Bouteille,^e Stéphane Ngampo,^f Ghislain Mpandzou,^g Silla Semballa,^a Philippe Vincendeau^a

Laboratoire de Parasitologie, UMR 177 IRD CIRAD, Université de Bordeaux, Bordeaux, France^a; Laboratoire de Parasitologie, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France^b; Polyclinique Marie-Louise Poto-Djembo, Pointe-Noire, Brazzaville, Republic of Congo^c; Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, INSERM U-1028, CNRS UMR-5292, Claude-Bernard Lyon 1 University, Lyon, France^d; Parasitology Department, University Hospital of Limoges, Limoges, France^e; National Control Programme for Human African Trypanosomiasis, Brazzaville, Republic of Congo^f; Neurology Ward, University Hospital of Brazzaville, Brazzaville, Republic of Congo^g

Arginase serum levels were increased in human African trypanosomiasis patients and returned to control values after treatment. Arginase hydrolyzes L-arginine to L-ornithine, which is essential for parasite growth. Moreover, L-arginine depletion impairs immune functions. Arginase may be considered as a biomarker for treatment efficacy.

Trypanosoma brucei gambiense and *T. brucei rhodesiense*, the causative agents of human African trypanosomiasis (HAT) or sleeping sickness, are tsetse fly-transmitted protozoan parasites (1). They multiply extracellularly in the bloodstream, lymph, and interstitial fluids during the disease first stage (stage 1). The second stage (stage 2) begins when they cross the blood-brain barrier. Major immune system impairments are observed (2). Medications are toxic and difficult to administer, in particular in stage 2. Diagnosis, treatment, and posttreatment follow-up remain complex due to poorly equipped health facilities and political unrest in most HAT foci; therefore, new biomarkers are needed.

The inducible metabolism of L-arginine plays an important role in infections (3). Arginase (two isoforms) hydrolyzes L-arginine to L-ornithine and urea. L-Arginine is the common substrate of arginases and nitric oxide (NO) synthases (NOS). Its depletion represents a limiting factor of NO production. The balance of inducible NOS/arginase is regulated by the patient's cytokine profile. L-ornithine is the precursor for the synthesis of L-glutamine, L-proline, and polyamines via the ornithine decarboxylase pathway (4). In trypanosomes, polyamines facilitate DNA and trypanothione synthesis, which is essential for maintaining the intracellular redox system and presenting a defense against oxidative stress (5). Moreover, L-arginine depletion, caused by arginase, leads to the loss of T cell receptor-associated CD3 ζ chain and stops T cell proliferation (3). Thus, increased arginase activity is likely to damage the host immune response and favor parasite growth.

Arginase activity and expression were measured in sera and cerebrospinal fluid (CSF) from HAT patients before treatment and 6 months later and from the sera of healthy controls. Patients ($n = 32$) were recruited from a previously described group (6). The field survey took place in the "Couloir" focus in the Republic of Congo (Brazzaville). The scientific protocol was approved by the WHO Research Ethic Review Committee and authorized by the Congo Ministry of Health. Informed consent was obtained from the patients. Screening tests on whole blood used the serological card agglutination trypanosomiasis test. Parasites were searched in aspirates from cervical lymph glands and/or blood after parasite concentration by capillary tube centrifugation and/or the mini-anion-exchange centrifugation technique (6). In-

clusion criteria stipulated that patients were parasitologically confirmed. HAT patients were classified as being in stage 1 ($n = 25$) or stage 2 ($n = 7$) according to patient CSF white blood cell counts and/or the absence or presence of CSF trypanosomes. Persons tested negative for HAT were enrolled as controls ($n = 23$) and matched for age and sex. HIV serology was performed to exclude HIV-positive people.

Two independent measures of arginase were performed. A sandwich enzyme immunoassay was performed to quantify human arginase I (liver type) according to the manufacturer's instructions (BioVendor, Heidelberg, Germany), as described previously (7). The result was confirmed by measurement of the arginase activity (8). Arginase activity indicates a potential role of this enzyme in ornithine production.

Arginase values are shown in Fig. 1. Intergroup comparisons were made by using a nonparametric test (Mann-Whitney U test). Tests of significance were two tailed. All P values of <0.01 were considered significant. The arginase activity was higher in HAT patients before treatment compared to controls (median values, 4.82 U/liter versus 2.65 U/liter, $P < 0.001$). The sample of stage 2 HAT patients was not statistically significant, but their arginase activity and expression levels were in the same range as those of stage 1 patients. Higher serum arginase I expression was measured in HAT patients compared to controls (median values, 37 ng/ml versus 17 ng/ml, $P < 0.001$). A high correlation was found between arginase activity and arginase expression (Spearman coefficient correlation $r = 0.84$). Arginase I expression and activity were not detected in patient CSF.

No differences were found between controls and HAT patients in terms of serum markers for hepatic injury and hemolysis. Val-

Received 21 December 2012 Returned for modification 14 February 2013

Accepted 1 April 2013

Published ahead of print 3 April 2013

Address correspondence to Philippe Vincendeau, philippe.vincendeau@u-bordeaux2.fr.

R.N.-B. and M.D. contributed equally to this article.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.03371-12

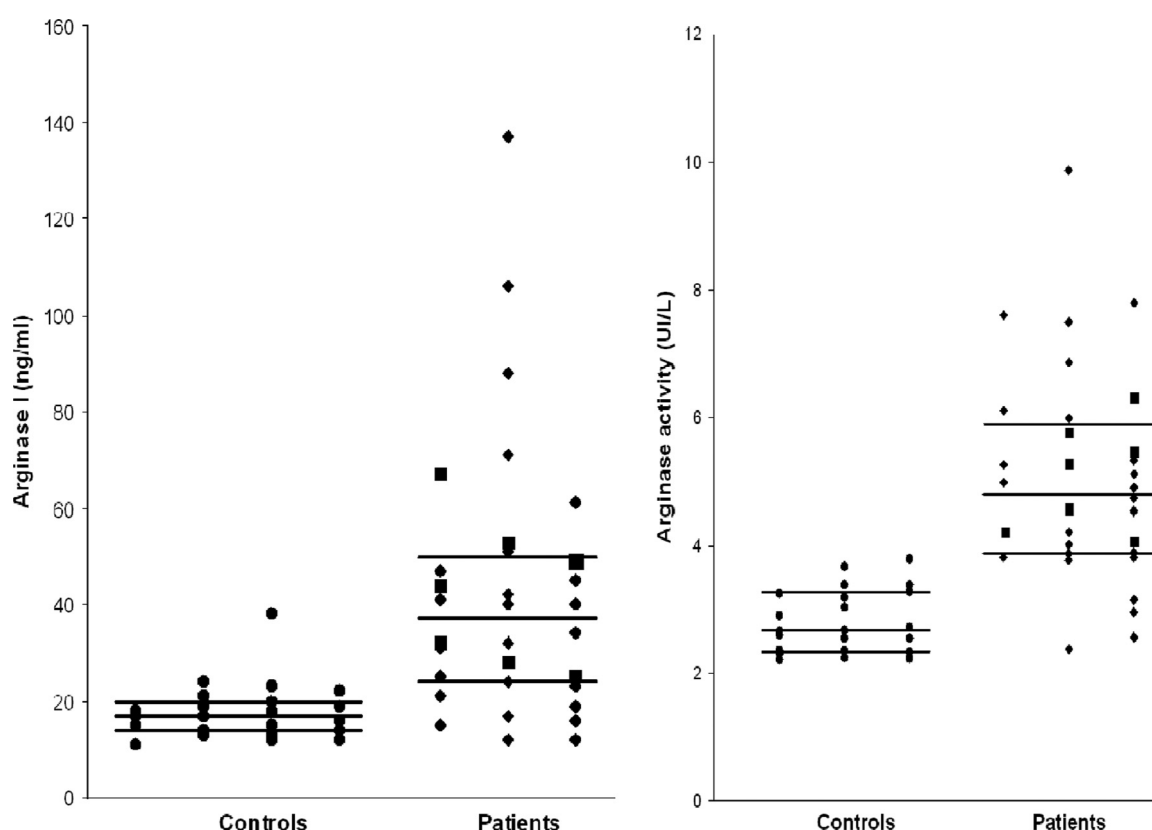


FIG 1 Determination of arginase I expression (left panel) and arginase activity (right panel) in sera from controls ($n = 23$) and patients with human African trypanosomiasis ($n = 32$) from the Couloir focus (Republic of Congo). ●, Controls; ◆, stage 1 patients; ■, stage 2 patients. Black lines represent the medians and quartiles for each group. The arginase activity was higher in HAT patients than in controls (median, 4.82 U/liter versus 2.65 U/liter, $P < 0.001$). Serum arginase I expression was higher in HAT patients than in controls (median, 37 ng/ml versus 17 ng/ml, $P < 0.001$).

ues, expressed as medians (interquartile ranges), for patients versus controls, respectively, were as follows: alanine amino transferase, 32.1 IU/liter (22.6 to 50.3 IU/liter) versus 31.6 IU/liter (22.5 to 48.1 IU/liter); aspartate amino transferase, 26.7 IU/liter (11.2 to 35.5 IU/liter) versus 25.9 IU/liter (11.4 to 36.2 IU/liter); total bilirubin, 13.3 μ mol/liter (8.2 to 17.6 μ mol/liter) versus 12.8 μ mol/liter (8.3 to 16.4 μ mol/liter); and indirect bilirubin, 6.8 μ mol/liter (5.4 to 8.5 μ mol/liter) versus 6.4 μ mol/liter (5.5 to 8.3 μ mol/liter). Treatment was performed as described previously (6): stage 1 patients received pentamidine, and stage 2 patients difluoromethyl ornithine.

Patient follow-up was performed 6 months later for comparison of pre- and posttreatment sera. Full comparisons were obtained for 14 patients who were present for the arginase follow-up. They were all parasitologically negative after treatment. Two patients maintained normal arginase levels. In the 12 patients with higher pretreatment serum arginase I expression (median, 43 ng/ml), values decreased after treatment (18.5 ng/ml, $P < 0.005$), to return to healthy control values (17 ng/ml) (Fig. 2). Treatment had a similar effect on arginase activity, with a median of 5.54 U/liter before treatment versus 2.72 U/liter afterward ($P < 0.001$). Posttreatment values were similar to healthy control values (2.65 U/liter).

High serum arginase levels, confirmed by two independent techniques, were found in HAT patients. Values resumed healthy control levels after treatment. The origin of this increase has not

yet been elucidated. The increase in arginase did not reflect hemolysis, since hemolysis serum markers were not found, and did not result from liver injury, since HAT patients did not exhibit any increase in the alanine amino transferase and aspartate amino transferase levels compared to healthy controls, a finding consistent with previous studies (9, 10). In trypanosome-infected mice, the arginase activity increases in macrophages, the main producers of arginase (11). Macrophages from trypanosome-susceptible mice exhibit a greater increase in arginase expression than those from resistant animals (12). In humans, various leukocyte subpopulations synthesizing arginase may be involved (13). High arginase blood levels have been measured in sera from acute hepatitis B, resulting in T cell function suppression, and in various cancers (14, 15, 16). High arginase activity has been measured in cutaneous leishmaniasis lesions (17). High interleukin-10 (IL-10) levels have been measured in HAT (18). Interestingly, a correlation has been reported between increased arginase activity and increased circulating IL-10 levels in trauma (19).

These findings support the hypothesis that arginase plays an essential role in HAT, in terms of parasite proliferation and/or impairment of immune responses. The assessment of NO production and, under suboptimal arginine concentrations due to arginase activity, the generation of various reactive species by inducible NOS represents a next step to investigating this impairment. The best times to perform arginase measurements in the fol-

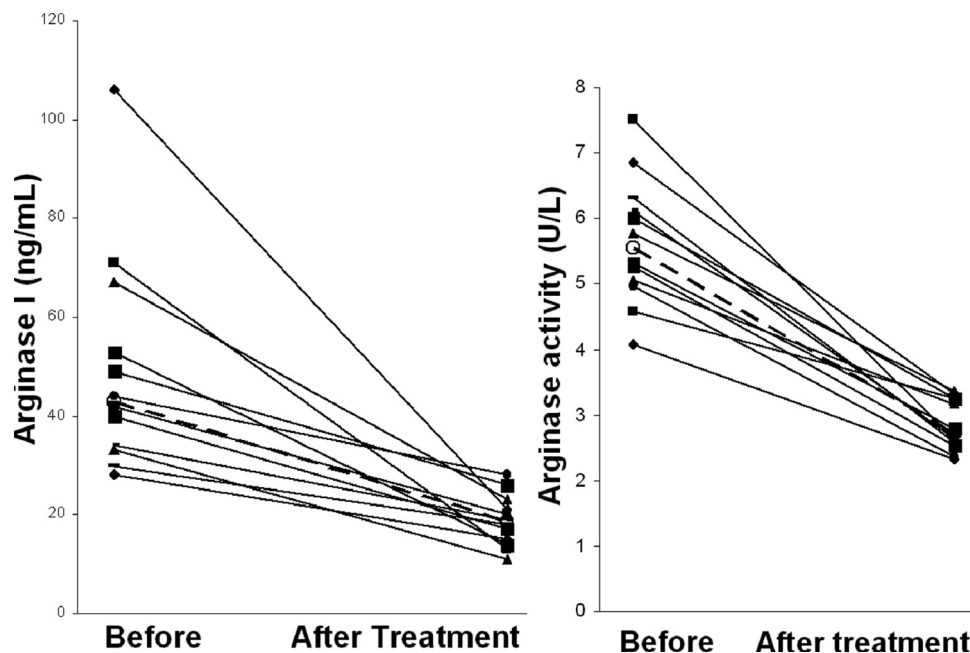


FIG 2 Determination of arginase I expression (left panel) and arginase activity (right panel) in sera from patients with human African trypanosomiasis before treatment and 6 months later ($n = 12$). Open circles ($\circ$) represent the median for each group. Values for each patient are joined by a black line, and medians are joined by a dashed line. Arginase I expression values (median, 43 ng/ml before treatment) decreased after treatment (median, 18.5 ng/ml, $P < 0.005$) to return to healthy control values (17 ng/ml). Arginase activity (median, 5.54 U/liter before treatment) decreased after treatment (median, 2.72 U/liter, $P < 0.001$) to return to healthy control values (2.65 U/liter).

low-up of stage 1 and stage 2 HAT patients, in addition to standard protocols, deserves further investigations.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was funded by WHO/TDR grant A50468, Le Conseil Régional d'Aquitaine, partner universities of Bordeaux, Limoges, and Lyon, and the Association pour le Développement de la Recherche en Parasitologie et Santé Tropicale.

REFERENCES

1. Van Meirvenne N, Le Ray D. 1985. Diagnosis of African and American trypanosomiasis. *Br. Med. Bull.* 41:156–161.
2. Vincendeau P, Bouteille B. 2006. Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* 78:645–665.
3. Grohmann U, Bronte V. 2010. Control of immune response by amino acid metabolism. *Immunol. Rev.* 236:243–264.
4. Munder M. 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br. J. Pharmacol.* 158:638–651.
5. Fairlamb AH, Cerami A. 1992. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annu. Rev. Microbiol.* 46:695–729.
6. Bouteille B, Mpandzou G, Cespuglio R, Ngampo S, Peeling RW, Vincendeau P, Buguet A. 2010. Cerebrospinal fluid B lymphocyte identification for diagnosis and follow-up in human African trypanosomiasis in the field. *Trop. Med. Int. Health* 15:454–461.
7. Ikemoto M, Tsunekawa S, Awane M, Fukuda Y, Murayama H, Igarashi M, Ngata A, Kasai Y, Totani M. 2001. A useful ELISA system for human liver-type arginase, and its utility in diagnosis of liver diseases. *Clin. Biochem.* 34:455–461.
8. Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modollell M. 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J. Immunol. Methods* 174:231–235.
9. Wellde BT, Chumo DA, Reardon MJ, Mwangi J, Asenti A, Mbwabi D, Abinya A, Wanyama L, Smith DH. 1989. Presenting features of Rhodesian sleeping sickness patients in the Lambwe Valley, Kenya. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 83(Suppl 1):73–89.
10. Bisser S, Bouteille B, Sarda J, Stanghellini A, Ricard D, Jauberteau MO, Marchan F, Dumas M, Breton JC. 1997. Contribution of biochemical tests in the diagnosis of the nervous phase of human African trypanosomiasis. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 90:321–326.
11. Gobert A, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher J, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect. Immun.* 68:4653–4657.
12. Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouède S, Boucher J, Wilson K, Veyret B, Gobert A. 2004. Mouse strain susceptibility to trypanosome infection: an arginase-dependent effect. *J. Immunol.* 172:6298–6303.
13. Wood KJ, Bushell A, Hester J. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nat. Rev. Immunol.* 12:417–443.
14. Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong HZ, Ferrari C, Bertolotti A. 2012. Increased levels of arginase in patients with acute hepatitis B suppress antiviral T cells. *Gastroenterology* 143:78–87.
15. de Boniface J, Mao Y, Schmidt-Mende J, Kiessling R, Poschke I. 2012. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase I in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. *Oncimmunology* 1:1305–1312.
16. Perez G, Olivares IM, Rodriguez MG, Ceballos GM, Garcia Sanchez JR. 2012. Arginase activity in patients with breast cancer: an analysis of plasma, tumors, and its relationship with the presence of the estrogen receptor. *Onkologie* 35:570–574.
17. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, Fry L, Seich Al Basatena NK, Corware K, Modollell M, Munder M, Tacchini-Cottier F, Müller I, Kropf P. 2012. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1684. doi:10.1371/journal.pntd.0001684.
18. Rhind SG, Sabiston BH, Shek PN, Buguet A, Muanga G, Stanghellini A, Dumas M, Radomski MW. 1997. The effect of melarsoprol treatment on circulating IL-10 and TNF- α level in human African trypanosomiasis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83:185–189.
19. Ochoa JB, Bernard AC, O'Brien WE, Griffen MM, Maley ME, Rockich AK, Tsuei BJ, Boulanger BR, Kearney PA, Morris SM, Jr. 2001. Arginase I expression and activity in human mononuclear cells after injury. *Ann. Surg.* 233:393–399.

Poster N° 2

Arginase serum level, a biomarker of treatment efficacy in human African trypanosomiasis

Nzourmbou-Boko R, Dethoua M, Gabriel F, Buguet A, Cespuaglio R, Courtois P, Daulouède S, Bouteille B, Ngampo S, Mpandzou G, Semballa S, Vincendeau P. UMR 177 IRD-CIRAD-Université de Bordeaux, Programme Trypano Congo

Abstract

Arginase serum levels were increased in human African trypanosomiasis (HAT) patients and resumed control values after treatment. Arginase hydrolyzes L-arginine to L-ornithine, essential for parasite growth. Moreover, L-arginine depletion impairs immune functions. Arginase may be considered as a biomarker for treatment efficacy.

Introduction

The inducible metabolism of L-arginine plays an important role in HAT. Arginase hydrolyzes L-arginine to L-ornithine and urea. L-ornithine is the precursor for polyamine synthesis, essential in trypanosome metabolism. L-arginine depletion caused by arginase represents a limiting factor of NO production (toxic to the parasites) and stops T cell proliferation. Arginase induction represents a newly-identified escape mechanism developed by trypanosomes to avoid the host's immune defenses and benefit increased synthesis of growth factors by the host (Gobert et al., 2000). In this study, we assessed the level of serum arginase in patients before and after treatment compared to the control.

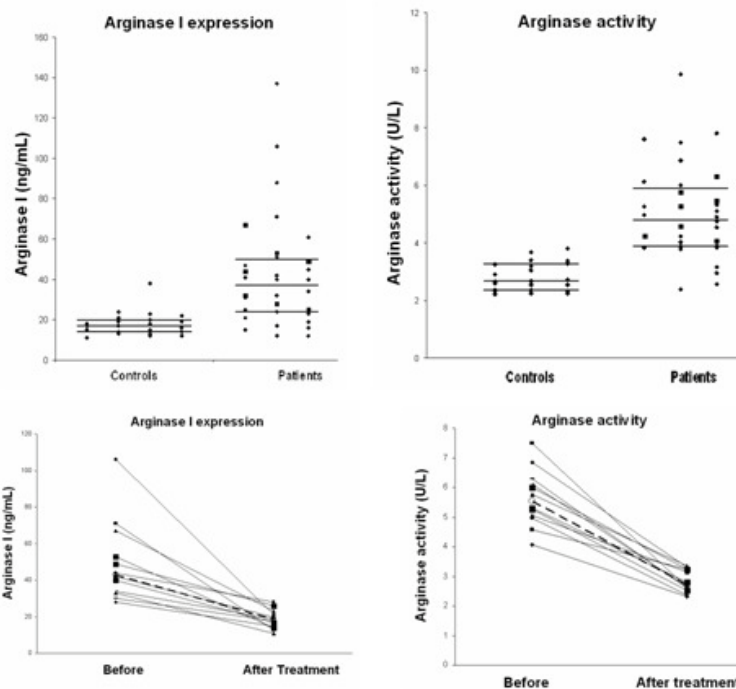
1. Methodology

- 1.1- Arginase expression (ELISA, Sandalova et al., 2012)
- 1.2- Arginase activity (Corralizza et al., 1994)



2. Resultats

2.1 The level of arginase is increased in the serum of patients compared to controls. (confirmed by two independent techniques).



2.2 Values resume control levels after treatment.

Conclusion

This normalization may represent a useful marker of treatment efficacy and deserves further investigation in the HAT patient follow-up, as a potential means of limiting the number of lumbar punctures.

References

- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods*.1994;174:231
- Gobert A, Daulouède S, Lepoivre M, Boucher J, Bouteille B, Buguet A, Cespuaglio R, Vevret B, Vincendeau P. 2000. L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect. Immun.* 68: 4653-4657.
- Sandalova E, Laccabue D, Boni C, Watanabe T, Tan A, Zong HZ, Ferrari C, Bertoletti A. 2012. Increased levels of arginase in patients with acute hepatitis B suppress antiviral T cells. *Gastroenterology*. 143:78-87.

Conclusion et perspectives

Ces résultats soutiennent l'hypothèse que l'arginase joue un rôle essentiel dans la THA, en termes de prolifération des parasites et / ou d'altération de la réponse immunitaire. L'induction de l'activité arginase représente un nouveau mécanisme d'immunomodulation élaboré par les trypanosomes pour éviter les défenses immunitaires de l'hôte et bénéficier de l'augmentation de la synthèse de facteurs de croissance par l'hôte.

Le niveau de l'arginase chez les patients THA a repris les valeurs du contrôle négatif après le traitement. Cette normalisation pourrait représenter un marqueur utile de l'efficacité du traitement et mérite une étude plus approfondie chez le patient THA. En outre, ce résultat se présente comme un moyen potentiel de limiter le nombre de ponctions lombaires.

En perspective pour cette étude, il serait nécessaire de :

- Evaluer l'arginase sérique chez les malades trypanosomés dans 3 foyers différents,
- Evaluer l'arginase dans les macrophage et granulocyte humains de patients trypanosomés et de sujets « contrôles » de la même zone d'endémie,
- Evaluer l'arginase dans les macrophage et granulocyte humains co-cultivés avec *T. brucei gambiense*,
- Etudier les différents récepteurs et voies de signalisation impliquées.

Article N° 3

**Evaluation of trypanocidal drugs used for
human African trypanosomosis against
*Trypanosoma lewisi***

&

**Induction de l'arginase par
*Trypanosoma lewisi***

Introduction

L'espèce humaine possède une protection innée contre la plupart des espèces de trypanosomes (Vanhamme *et al.*, 2003). Cependant, des cas de trypanosomose humaine atypique (THat) causés par des espèces pathogènes pour les animaux ont été rapportés. Certains sont asymptomatiques ou bénins, d'autres sont mortels (Sha *et al.*, 2011). Le nombre de cas de THat est peut être sous estimé, le risque et l'impact potentiel qui y sont liés ne peuvent pas être actuellement évalués car les données diagnostiques, cliniques et épidémiologiques demeurent insuffisantes (Truc *et al.*, 2013). Des cas récents de THAat sont liés à l'absence d'ApoL1, d'autres ne sont pas liés à l'immunosuppression et à des prédispositions génétiques (Truc *et al.*, 2013).

Plusieurs cas d'infection humaine à *T. lewisi* parasite naturel de rat ont été rapportés en Asie (Sarataphan *et al.*, 2011 ; Doke *et al.*, 2011 ; Verma *et al.*, 2011). L'immuno-immaturité ou l'immunodépression pourraient rendre cette espèce pathogène pour les primates et donc l'homme. Cependant, aucune évaluation de l'efficacité des médicaments trypanocides, n'a été effectuée contre ces trypanosomes.

Sur le modèle *T. lewisi*, nous avons évalué, à la demande de l'OMS, l'efficacité de la combinaison thérapeutique associant l'eflornithine (Difluro methyl ornithine), un analogue structural de l'ornithine, inhibiteur de l'arginase et surtout de l'ornithine décarboxylase, et le nifurtimox, un donneur de NO. L'utilisation de l'eflornithine et du NECT souligne l'importance de la voie de synthèse des polyamines dans les trypanosomoses. La conception des combinaisons thérapeutiques encouragées par l'OMS permettrait de prévenir l'apparition de résistance. Ces bi ou tri thérapies combinent des molécules ayant des modes d'action différentes et dont l'association est synergique. En outre, les effets de *T. lewisi* et de ses ESF sur l'induction de l'arginase macrophagique murine ont été également déterminés.

En plus de la combinaison NECT, nous avons aussi évalué l'efficacité des trypanocides disponibles utilisés dans la THA sur le *T. lewisi*. En outre, l'effet trypanocide de fexinidazole, candidat médicament en phase 3 d'essai clinique dans la THA a été aussi évalué. L'évaluation de ces médicaments et candidats médicaments permettra la prise en charge thérapeutique des nouveaux cas de THAat à *T. lewisi*.

Evaluation of trypanocidal drugs used for human African trypanosomosis against *Trypanosoma lewisi*

Mariette Dethoua^{1,a}, Romaric Nzoumbou-Boko^{1,a}, Philippe Truc², Sylvie Daulouède¹, Pierrette Courtois¹, Bruno Bucheton², Gérard Cuny², Silla Semballa¹, and Philippe Vincendeau^{1,*}

¹ Laboratoire de Parasitologie, BP 43, UMR 177 IRD CIRAD Université de Bordeaux, 33076 Bordeaux Cedex, France

² Institut de Recherche pour le Développement, Unité Mixte de Recherche 177 IRD-CIRAD, Campus International de Baillarguet, TA A17/G, 34398 Montpellier Cedex 5, France

Received 13 September 2013, Accepted 6 October 2013, Published online 22 October 2013

Abstract – Trypanosomes from animals are potential pathogens for humans. Several human cases infected by *Trypanosoma lewisi*, a parasite of rats, have been reported. The number of these infections is possibly underestimated. Some infections were self-cured, others required treatment with drugs used in human African trypanosomosis. An *in vitro* evaluation of these drugs and fexinidazole, a new oral drug candidate, has been performed against *T. lewisi* in comparison with *T. brucei gambiense*. All have comparable activities against the two parasites. Suramin was not effective. *In vivo*, drugs were tested in rats immunosuppressed by cyclophosphamide. The best efficacy was obtained for fexinidazole, and pentamidine (15 mg/kg): rats were cured in 7 and 10 days respectively. Rats receiving nifurtimox-eflornithine combination therapy (NECT) or pentamidine (4 mg/kg) were cured after 28 days, while melarsoprol was weakly active. The identification of efficient drugs with reduced toxicity will help in the management of new cases of atypical trypanosomosis.

Key words: Trypanosome, *Trypanosoma lewisi*, Trypanocidal drugs, Fexinidazole, Atypical trypanosomiasis.

Résumé – Évaluation des médicaments trypanocides utilisés dans la trypanosomose humaine africaine contre *Trypanosoma lewisi*. Les trypanosomes d'animaux sont potentiellement pathogènes pour l'homme. Plusieurs infections humaines par *Trypanosoma lewisi*, parasite du rat, ont été rapportées. Leur nombre est probablement sous-estimé. Certaines de ces infections auto-guérissent, d'autres nécessitent un traitement avec des médicaments utilisés dans la trypanosomose humaine africaine. Une évaluation *in vitro* de ces médicaments et du fexinidazole, un nouveau candidat-médicament actif par voie orale, a été réalisé sur *T. lewisi* en comparaison avec *T. brucei gambiense*. Tous ont présenté des effets comparables contre les deux parasites sauf la suramine qui n'était pas efficace. *In vivo*, ces médicaments ont été administrés à des rats immunodéprimés par le cyclophosphamide. La meilleure efficacité a été obtenue avec le fexinidazole et la pentamidine (15 mg/kg) : les rats ont été guéris en respectivement 7 et 10 jours. Ceux recevant la combinaison thérapeutique nifurtimox-éflornithine (NECT) ou pentamidine (4 mg/kg) ont été guéris au bout de 28 jours, tandis que le mélarsoprol était faiblement actif. L'identification de médicaments efficaces peu toxiques aidera à la prise en charge de nouveaux cas de trypanosomose atypique.

Introduction

Trypanosoma (Herpetosoma) lewisi is an extracellular protozoan blood parasite of rats and is distributed worldwide [8]. It is naturally transmitted to rats by fleas. *T. lewisi* has a limited antigenic variation [6, 15]. In rats, *T. lewisi* infection is self-limited leading to elimination of circulating parasites and protection against re-infection. The typical pathogenic human

trypanosomes are *T. brucei gambiense*, *T. b. rhodesiense* and *T. cruzi* [8]. Humans possess an innate protection against most trypanosomes species from animals [21]. However, trypanosomes from animals can in some cases be pathogens for humans. For instance, in 1933, a case of febrile Malaysian child presenting numerous *T. lewisi* parasites was reported [13]. In India, *T. lewisi* were detected in two adults [18] leading to self-cured while a baby was treated using pentamidine in 2010 [23]. These atypical human infections by animal trypanosomes were recently reviewed [20]. However, no evaluation of trypanocidal drugs, including the combination nifurtimox/eflornithine NECT [17], has been performed against *T. lewisi*. In this

^a Mariette Dethoua and Romaric Nzoumbou-Boko contributed equally to this article

* Corresponding author:

philippe.vincendeau@u-bordeaux2.fr

study, the efficacy of these drugs against *T. lewisi* was investigated *in vitro* and *in vivo* in cyclophosphamide (CPA)-treated and *T. lewisi*-infected rats [5]. The efficacy of Fexinidazole, a new oral nitroimidazole drug candidate for treatment of both stages in human African trypanosomiasis (HAT), was also evaluated [19].

Materials and methods

Animals and ethics

Female Swiss mice, 18–20 g, and Wistar rats, 90–100 g (Charles River, L'Arbresle, France) were kept in our animal housing facility for more than a week before the experiment was started. Experiments on animals complied with guidelines of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (CETS No. 123). Experiments were approved by the Department for the protection of animals and plants of the Préfecture de la Gironde (January 2012) including experiments on drug activity and toxicity (Identification number A33-063-324).

Parasites

T. b. gambiense (Feo/ITMAP/1893) was used for *in vitro* experiment. Swiss mice were infected by intraperitoneal injection (IP) with 10^4 parasites diluted in physiological saline.

T. lewisi (Wery L307 24/9/68), kindly provided by Étienne Pays and Pierrick Uzureau (Université Libre de Bruxelles, Gosseles, Belgium), was used for *in vitro* and *in vivo* experiments. Rats were infected by IP injection of 5×10^4 parasites diluted in physiological saline.

Parasites were purified from rodent blood using DEAE-cellulose.

Drugs

Current drugs used in HAT (pentamidine, suramin, melarsoprol, eflornithine, nifurtimox) were kindly supplied by World Health Organization. Fexinidazole was kindly supplied by Sanofi.

In vitro assessment of drugs

Each well of a 96-well plate (Falcon Plastics, Oxnard, CA, USA) was filled with 100 μ L of culture medium McCoy 5A modified medium supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 25 mM HEPES, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 2 mM sodium pyruvate, 0.2 mM *L*-cysteine and 10% foetal calf serum [1, 24]. Nifurtimox and fexinidazole were first dissolved in 100% dimethyl sulphoxide (DMSO). Adequate dilutions in culture medium of each compound were added into each well in triplicate while control wells contained medium alone or with DMSO (0.4%). Then 100 μ L of a suspension containing 10^5 blood-purified parasites was added in each well. Cultures were maintained at 37 °C in 5% CO₂ incubator for 24 h. Parasite count was performed using a haemocytometer. The activity was expressed in concentration inhibiting

parasite growth by 50% (IC₅₀) [16]. All experiments were performed twice, with each drug concentration in triplicate. The mean of IC₅₀ and standard deviation (SD) obtained for the six cultures of each drug were calculated.

In vivo assessment

Female rats were immunosuppressed by IP injection of CPA (100 mg/kg) 72 h before infection by IP injection of 5×10^4 purified *T. lewisi* diluted in physiological saline.

On day 7 after infection, parasitemias were evaluated in blood collected by tail cutting [9]. Parasite counting was carried out using an haemocytometer for each rat, and six groups of seven rats were then randomly distributed:

- One group received pentamidine (4 mg/kg) by IP injection for 28 days;
- One group received pentamidine (15 mg/kg) by IP injection for 12 days;
- One group received three cures of melarsoprol (3.6 mg/kg/day) by IP injection, each cure is composed of 3 days spaced by a 7 day resting period;
- One group received fexinidazole (100 mg/kg) orally for 10 days;
- One group received eflornithine (200 mg/kg, twice a day) by IP injection and nifurtimox (10 mg/kg, twice a day) orally for 28 days;
- One group (control group) received physiological saline (0.5 mL/day) by IP injection for 28 days.

The number of parasites observed for each group was estimated as the mean of daily parasitaemia of the seven rodents.

Statistical analysis

Parasitaemias are represented as the mean of the group $\pm$ SD. The comparisons between groups were made using the non-parametric Wilcoxon/Kruskal-Wallis test implemented in the JMP7 software.

Results

In vitro activity of drugs against trypanosomes

The reference drugs, pentamidine, suramin, melarsoprol, eflornithine and fexinidazole, were assessed for *in vitro* efficacy against trypanosomes. Their activity against *T. lewisi* and *T. b. gambiense* was compared. Pentamidine, eflornithine, nifurtimox and fexinidazole have comparable activities against the two parasites while melarsoprol is less active against *T. lewisi* than *T. b. gambiense* (Table 1). Suramin was not effective against the two parasites, and, due to its toxicity [22], suramin was not investigated further. The highest concentration of DMSO (0.4% in culture medium) had no trypanocidal activity.

In vivo assessment of drugs

In rats infected by *T. lewisi* but not immunosuppressed by CPA, the blood parasite number was too low to allow a comparison between drugs (data not shown).

Table 1. *In vitro* activities of trypanocidal drugs (IC₅₀ (μM)).

	<i>T. lewisi</i>	<i>T. b. gambiense</i>
Melarsoprol	0.09 ± 0.01	0.03 ± 0.01
Pentamidine	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02
Eflornithine	20.5 ± 8.7	25.1 ± 12.4
Nifurtimox	4.25 ± 1.06	3.12 ± 1.27
Fexinidazole	3.75 ± 0.85	2.55 ± 0.42

Each result is the mean ± SD of IC₅₀ for six cultures.

For rats which received CPA (100 mg/kg) 3 days before infection, drugs were given orally or by IP injection starting at day 7 after infection when parasite blood count was about 1.5×10^7 /mL.

No animal died. In the control group (animals injected with physiological saline), a steady decrease of blood parasitaemia was observed after day 10. Nevertheless some animals remained infected over the all experimental period and still displayed parasitaemia levels ($>10 \times 10^6$ parasites/mL) 43 days after infection. As compared to controls, the control of parasitaemia was quicker for the animals of the fexinidazole and pentamidine (15 mg/kg) groups with all animals being cured respectively 7 and 10 days after treatment. The decay rate of blood parasitaemia was slower in the NECT and pentamidine (4 mg/kg) groups and all animals were cured after 33 and 35 days post infection respectively. Mean parasitaemia (parasites/mL) was however significantly lower ($p = 0.006$) in the NECT group (9×10^6 ; calculated from day 7 to day 32 post infection) than in the pentamidine (4 mg/kg) group (15.8×10^6 ; calculated from day 7 to day 34 post infection). The evolution of parasitaemia in the melarsoprol group was not significantly different from the controls until day 33 post infection and animals were finally cured at day 42 post infection although three animals of this group died during the experiment whereas no animal from others groups died. For each group, the sum of daily parasitaemia means (considered as whole parasite load and corresponding to area under the curves in Figure 1) ±SD was assessed from day 6 to day 43 post infection. The values were 724.36 ± 53 for control group, 103.76 ± 9.2 for fexinidazole group, 167.264 ± 11.1 for pentamidine (15 mg/kg) group, 252.318 ± 22.1 for NECT group, and 412.578 ± 28 for pentamidine (4 mg/kg) group. Compared to control group, parasite load was lower in all treated groups ($p < 0.001$). Compared to pentamidine (15 mg/kg) group, parasite load was lower in fexinidazole group ($p < 0.05$).

All treated rats remained negative in parasitology until 90 days post infection.

Discussion

In this study, the efficacy of drugs for HAT treatment and fexinidazole against *T. lewisi* was demonstrated both *in vitro* and *in vivo*.

Melarsoprol and pentamidine have already been used successfully in two *T. lewisi* human infections [11, 23]. *In vitro* studies reveal a comparable susceptibility profile of *T. lewisi* and *T. b. gambiense*. Fexinidazole was both efficient against *T. lewisi* and *T. b. gambiense*. A single strain of *T. lewisi* was

tested and other ones from various sources will be analysed very soon. However, fexinidazole possesses an *in vitro* trypanocidal efficiency on all tested *brucei* subspecies, in the range of 0.7–3.3 μM and is also efficient on other parasites [2–30].

Rats were immunosuppressed using CPA at non-lethal doses to increase parasitemias [5]. In spite of heavy parasitaemia developed in CPA-treated rats, the brain remained free of parasites [5]. CPA mediates immunosuppression, which might mimic a potential but not established immunodeficiency in atypical human infections by animal trypanosomes. Some trypanocidal drugs require an intact immune system for clearance of trypanosomes [4] whereas nitroimidazoles are active compounds against various infectious agents, largely used and efficient in immunocompromised patients [10]. Fexinidazole and NECT were active at the doses recommended for HAT treatment but cure was obtained earlier with fexinidazole. However, fexinidazole may be active at lower doses and a further study will determine its minimum effective dose. Pentamidine was not active at the dose of 4 mg/kg, which is recommended in humans for African trypanosomiasis and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia treatment. As superior doses exhibit activity in *Pneumocystis jirovecii*-infected rats [29], a 15 mg/kg dose was also assessed in *T. lewisi*-infected rats and was efficient.

Whereas human infections with *T. lewisi* can self-cure, it is not always the case [20]. Thus evaluating the efficacy of available drugs is of interest, in particular when *T. lewisi* are present in cerebrospinal fluid, as reported previously [11]. Fexinidazole and NECT are both efficient for patients in the neurological stage of HAT [19]. Compared to melarsoprol and eflornithine, NECT has a reduced toxicity and is much easier to administer [17]. Animal toxicology studies reveal that fexinidazole has an excellent safety profile [19]. A reduced toxicity of the drug, a better control of parasite number and persistence, a reduced production of TNF-α and reactive oxygen species by activated macrophages [25] might be beneficial in treatment by fexinidazole.

The number of atypical human infections attributable to primarily animal trypanosomes is possibly underestimated, mainly due to lack of tools and strategies to better detect infection [20]. Interaction with others factors might be involved in atypical human infections by animal trypanosomes. For instance, diet deficiency enhanced *T. lewisi* infections in rats, as also reported for the related murine parasite, *T. musculi* [12]. Moreover, immunomodulation of immune response might also be involved. The binding of immunoglobulins by parasites via receptors for their Fc region might cover parasites and decrease the efficiency of host immune response [3, 30]. The risk and potential impact related to atypical human infections by animal trypanosomes cannot be evaluated thoroughly at the present time and further studies are required. However the identification of drugs efficient against *T. lewisi* with reduced toxicity will help in the management of new cases. Fexinidazole and pentamidine (15 mg/kg) represent valuable drugs to treat *T. lewisi* infections.

Acknowledgements. We thank Dr. Jean Jannin and Dr. Péré Perez Simarro (World Health Organization) for the supply of pentamidine, suramin, melarsoprol, eflornithine, nifurtimox and Dr. Olivier Petigny (Sanofi) for the supply of fexinidazole. The technical assistance by Patricia Nabos was greatly appreciated. We thank le Service de coopération et d'action culturelle de l'Ambassade de France a

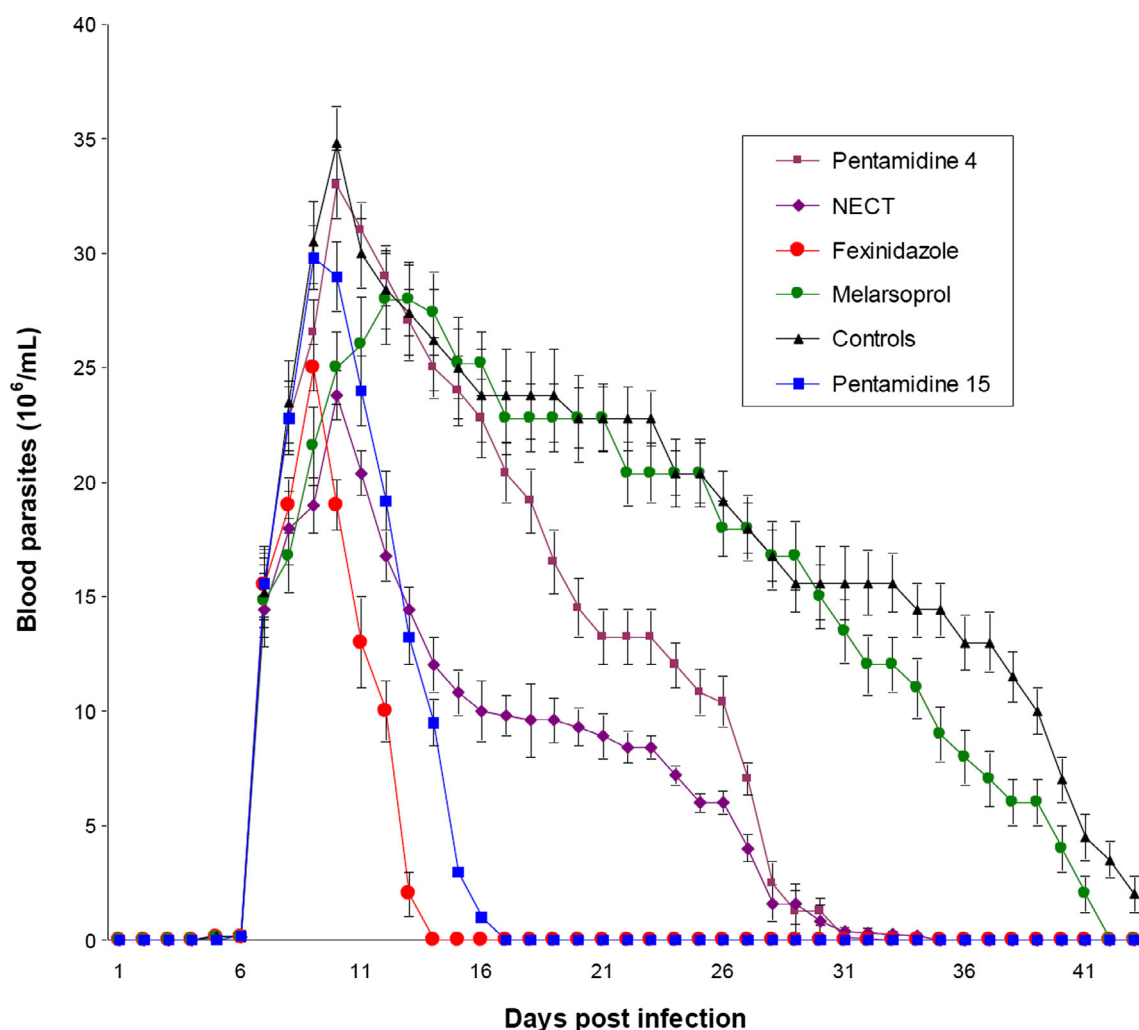


Figure 1. Evolution of parasitemias for *T. lewisi*-infected rats during 43 days after infection. Rats were infected by IP injection of 5×10^4 purified *T. lewisi* and randomly divided in six groups at day 7 post infection. Each group received drugs as described. Parasitemias were monitored every day.

Bangui, le conseil régional d'Aquitaine and l'Association pour le développement de la recherche en parasitologie et santé tropicale for continuous support.

References

- Albright JW, Albright JF. 1980. *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi* in cell-free medium conditioned by rodent macrophages and mercaptoethanol. *International Journal of Parasitology*, 10, 137–142.
- Bahia MT, de Andrade IM, Martins TA, do Nascimento ÁF, Diniz Lde F, Caldas IS, Talvani A, Trunz BB, Torreele E, Ribeiro I. 2012. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1870. Doi: [10.1371/journal.pntd.0001870](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001870)
- Balber AE, Sturtevant JE. 1986. A surface glycoprotein of *Trypanosoma lewisi* binds immunoglobulin G from the serum of uninfected rats. *Infection and Immunity*, 53, 420–426.
- Berger BJ, Fairlamb AH. 1992. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. *Parasitology*, 105, S71–S78.
- Budovsky A, Prinsloo I, El-On J. 2006. Pathological developments mediated by cyclophosphamide in rats infected with *Trypanosoma lewisi*. *Parasitology International*, 55, 237–242.
- D'Alessandro PA, Behr MA. 1991. *Trypanosoma lewisi* and its relatives. In Krerer J, Baker JR (Eds.), *Parasitic protozoa*. Academic Press, New York, pp. 225–263.
- Hirumi H, Hirumi K. 1989. Continuous cultivation of *Trypanosoma brucei* blood stream forms in a medium containing a low concentration of serum protein without feeder cell layers. *Journal of Parasitology*, 75, 985–989.
- Hoare CA. 1972. *The Trypanosomes of Mammals*. A Zoological Monograph. Blackwell Scientific Publications: Oxford and Edinburgh. p. 1–749.
- Holzmüller P, Dg Biron, Courtois P, Koffi M, Bras-Gonçalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V. 2008. 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 and Infections*, 10, 79–86.
- Hosseini pour MC, Napravnik S, Joaki G, Gama S, Mbeye N, Banda B, Martinson F, Hoffman I, Cohen MS. 2007. HIV and parasitic infection and the effect of treatment among adult

- outpatients in Malawi. *Journal of Infectious Diseases*, 195, 1278–1282.
11. Howie S, Guy M, Fleming L, Bailey W, Noyes H. 2006. A Gambian infant with fever and an unexpected blood film. *PLoS Medicine*, 3, 1508–1512.
 12. Humphrey PA, Ashraf M, Lee CM. 1997. Growth of trypanosomes *in vivo*, host body weight gains, and food consumption in zinc-deficient mice. *Journal of the National Medical Association*, 89, 48–56.
 13. Johnson PD. 1933. A case of infection by *Trypanosoma lewisi* in a child. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 26, 467–468.
 14. Kaiser M, Bray MA, Cal M, Bourdin Trunz B, Torreele E, Brun R. 2011. Antitrypanosomal activity of fexinidazole, a new oral nitroimidazole drug candidate for treatment of sleeping sickness. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55, 5602–5608.
 15. Molyneux D. 1976. Biology of the trypanosomes of the subgenus *Herpetosoma*, in *Biology of the Kinetoplastida*. Lumsden WHR, Evans DA (Eds.), Academic Press: London. pp. 285–325.
 16. Pomel S, Biot C, Bories C, Loiseau PM. 2013. Antiprotozoal activity of ferroquine. *Parasitology Research*, 112, 665–669.
 17. Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V. 2009. Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet*, 374, 56–64.
 18. Shrivastava KK, Shrivastava GP. 1974. Two cases of *Trypanosoma (Herpetosoma)* species infection of man in India. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 143–144.
 19. Torreele E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Fexinidazole. 2010. A new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(12), e923. Doi: [10.1371/journal.pntd.0000923](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000923)
 20. Truc P, Büscher P, Cuny G, Mi Gonzatti, Jannin J, Prashant J, Prayag J, Zhao-Rong L, Mattioli R, Pays E, Simarro PP, Geraldes-Teixeira MM, Touratier L, Vincendeau P, Desquesnes M. 2013. Atypical human infections by animal trypanosomes. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(9), e2256, Doi: [10.1371/journal.pntd.0002256](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002256)
 21. Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Van Den Abbeele J, Pays A, Tebabi P, Van-Xong H, Jacquet A, Moguilevsky N, Dieu M, Kane J, De Baetselier P, Brasseur R, Pays E. 2003. Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. *Nature*, 422, 83–87.
 22. Van Voorhis WC. 1990. Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. *Drugs*, 40, 176–202.
 23. Verma A, Manchanda S, Kumar N, Sharma A, Goel M. 2011. *Trypanosoma lewisi* or *T. lewisi*-like infection in a 37 day old infant. *American Journal of Tropical Medicinal and Hygiene*, 85, 221–224.
 24. Vincendeau P, Daulouède S, Veyret B, Darde ML, Bouteille B, Lemesre JL. 1992. Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei gambiense* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Experimental Parasitology*, 75, 353–360.
 25. Vincendeau P, Caristan A, Pautrizel R. 1981. Macrophage functions during *Trypanosoma musculi* infection in mice. *Infections and Immunity*, 34, 78–81.
 26. Vincendeau P, Daeron M. 1989. *Trypanosoma musculi* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE, and IgG subclasses. *Journal of Immunology*, 142, 1702.
 27. Vincendeau P, Guillemain B, Daulouède S, Ripert C. 1986. *In vitro* growth of *Trypanosoma musculi* requirements of cells and serum-free culture medium. *International Journal of Parasitology*, 16, 387–390.
 28. Vincendeau P, Daeron M, Daulouède S. 1986. Identification of antibody classes and Fc receptors responsible for phagocytosis of *Trypanosoma musculi* by mouse macrophages. *Infection and Immunity*, 53, 600–606.
 29. Walzer PD, Kim CK, Foy J, Linke MJ, Cushion MT. 1988. Cationic antitrypanosomal and other antimicrobial agents in the therapy of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32, 896–905.
 30. Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FR, Norval S, Kime R, Read KD, Fairlamb AH. 2012. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Science Translational Medicine*, 4, 119. Doi: [10.1126/scitranslmed.3003326](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003326)

Cite this article as: Dethoua M, Nzoumbou-Boko R, Truc P, Daulouède S, Courtois P, Bucheton B, Cuny G, Semballa S & Vincendeau P: Evaluation of trypanocidal drugs used for human African trypanosomiasis against *Trypanosoma lewisi*. *Parasite*, 2013, **20**, 39.



An international open-access, peer-reviewed, online journal publishing high quality papers on all aspects of human and animal parasitology

Reviews, articles and short notes may be submitted. Fields include, but are not limited to: general, medical and veterinary parasitology; morphology, including ultrastructure; parasite systematics, including entomology, acarology, helminthology and protistology, and molecular analyses; molecular biology and biochemistry; immunology of parasitic diseases; host-parasite relationships; ecology and life history of parasites; epidemiology; therapeutics; new diagnostic tools.

All papers in Parasite are published in English. Manuscripts should have a broad interest and must not have been published or submitted elsewhere. No limit is imposed on the length of manuscripts.

Parasite (open-access) continues **Parasite** (print and online editions, 1994–2012) and **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée** (1923–1993) and is the official journal of the Société Française de Parasitologie.

Editor-in-Chief:
Jean-Lou Justine, Paris

Submit your manuscript at
<http://parasite.edmgr.com/>

Induction de l'arginase macrophagique murine par *T. lewisi*

Le *T. lewisi*, parasite responsable d'une trypanosomose atypique chez l'homme, et ses ESF, préparés dans les mêmes conditions que ceux de *T. musculi*, induisent également l'activité arginase macrophagique *in vitro*.

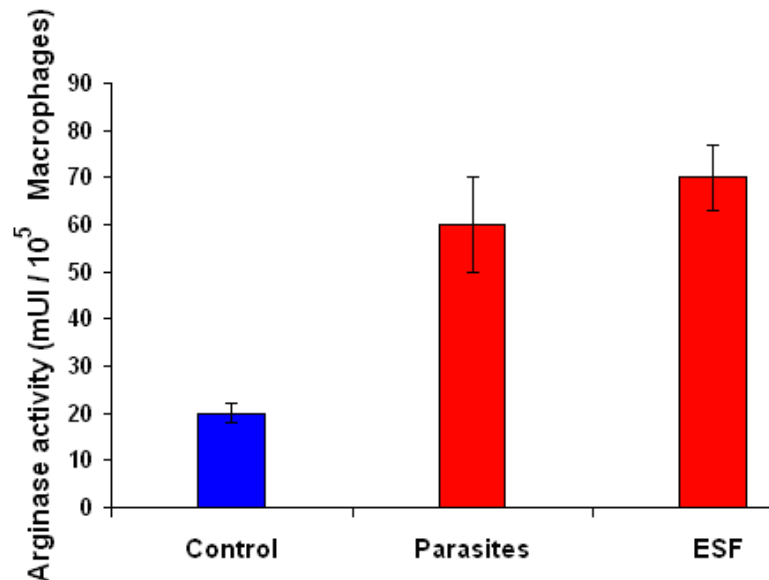


Figure N° 1: Induction de l'activité arginase dans les macrophages péritonéaux de souris par *T. lewisi* et ses ESF

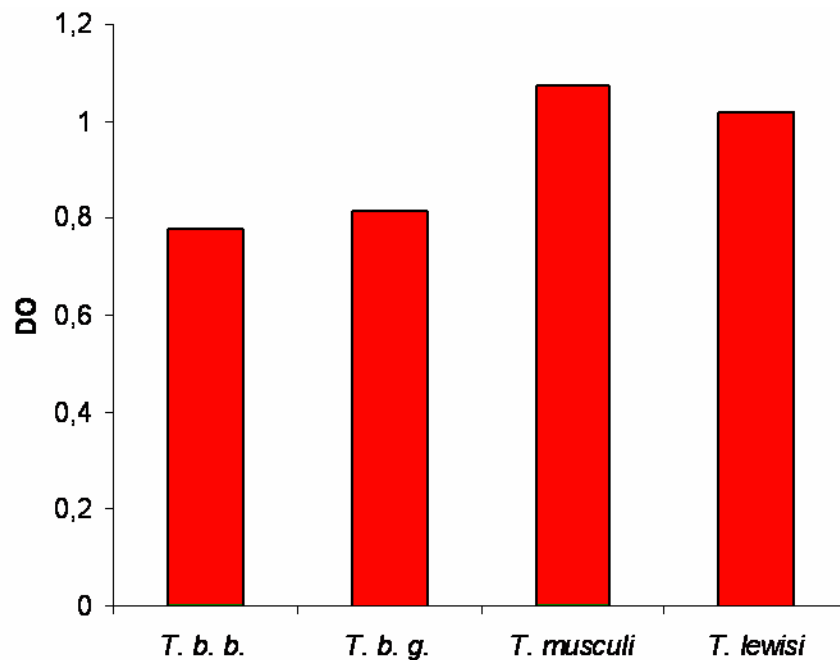


Figure N°2 : ELISA de ESF de *T.b.b.*, *T.b.g.*, *T.musculi* et *T.lewisi* versus 2C12. L'anticorps monoclonal 2C12 reconnaît un épitope en commun dans les 4 sécrétums.

Conclusion et perspectives

L'inhibition de la voie des polyamines par le NECT empêche la prolifération parasitaire chez le rat. La découverte de nouveau médicament ciblant cette voie métabolique permettra d'enrichir notre arsenal thérapeutique.

L'induction de l'arginase macrophagique par *T. lewisi* et ses facteurs solubles souligne une conservation de ce mécanisme chez les trypanosomes. La reconnaissance par l'anticorps monoclonal d'un épitope en commun dans les ESF de *T. brucei. gambiense*, *T. brucei.brucei*, *T. musculi* et *T. lewisi*, soutient le concept de la conservation du mécanisme conduisant à l'induction de l'arginase macrophagique par ces parasites

En perspectives pour cette partie, il serait important :

- d'évaluer l'arginase sérique dans le sérum des rats avant et après traitement ;
- d'évaluer l'effet du mannose et du 2C12 sur le *T. lewisi* ;
- d'évaluer les co-thérapies Eflornéthine-mannose, fexinidazole-mannose, nifurtimox-mannose.

Discussion Générale

L'interaction hôte-parasite est à l'origine d'une série de processus physiologiques, et en particulier immunitaires, permettant à l'hôte de se défendre face à ces pathogènes, pour arrêter ou limiter leur développement. Les parasites ont, depuis longtemps, mis en jeu des mécanismes pour échapper ou s'adapter aux réponses de l'organisme afin de promouvoir leur multiplication et de prolonger leur survie. Certains parasites comme *Leishmania* ssp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* ont adopté la localisation intracellulaire pour échapper au système immunitaire, ou résister à la pression de l'organisme. Dans cette localisation intracellulaire, ils sont obligés de développer d'autres mécanismes supplémentaires pour échapper aux processus de destruction (enzymes lytiques, synthèse de dérivés oxygénés).

Les trypanosomes extracellulaires (*T. b. gambiense*, *T. b. rhodesiense*, *T. b. brucei*, *T. musculi* et *T. lewisi*) sont continuellement exposés aux éléments du système immunitaire, ce qui les a amenés à mettre en place des mécanismes d'échappement performants. En plus des mécanismes déjà bien identifiés, nous venons d'apporter des éléments concordants mettant en évidence l'implication de la voie de l'arginase comme un mécanisme d'immunomodulation élaboré et conservé au cours de l'évolution par les trypanosomes, favorisant leur développement.

Implication de l'arginase dans les trypanosomoses

Plusieurs résultats convergents nous ont permis de confirmer l'implication de l'arginase dans les trypanosomoses. Nous avons mis en évidence, *in vitro*, l'induction de l'arginase macrophagique par *T. musculi* qui favorise la prolifération. Celle-ci est entravée en présence du BEC, un inhibiteur de l'arginase. Nous avons montré une corrélation entre augmentation de la parasitémie et de l'activité arginase dans la trypanosomose murine à *T. musculi*. Cette activité arginase est confirmée par l'augmentation de l'ARNm de l'arginase 1, qui au pic de la parasitémie, est 6 fois plus élevée que celle des témoins. Ces résultats confirment ceux obtenus dans le modèle expérimental d'infection par *T. b. brucei*, où le rôle de l'arginase dans le développement d'une infection a été mis en évidence pour la première fois (Gobert *et al.*, 2000). Dans ce modèle, la parasitémie évolue très rapidement. Chez la souris infectée par *T. musculi*, son parasite naturel, la parasitémie commence à augmenter vers le 7^{ème} jour et il y a une corrélation entre l'activité de l'arginase et la parasitémie. Dans une étude similaire sur un modèle de leishmaniose murine *in vivo*, une corrélation entre l'augmentation de la parasitémie et la hausse de l'activité arginase a également été observée (Krapf *et al.*, 2005).

Nous avons recherché si l'induction de l'arginase est également présente dans la THA. Le niveau de l'activité de l'arginase sérique est augmenté chez les patients atteints de THA et retourne à des valeurs normales après un traitement efficace. Dans une étude préliminaire *in vitro*, *T. b. gambiense* induit l'activité arginase au niveau des leucocytes totaux humains par rapport aux contrôles. Cette induction de l'activité arginase s'est révélée également dans les infections par *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* ssp., *Mycobacterium tuberculosis* (Dulgerian *et al.*, 2011, Lacerda *et al.*, 2011 ; Balaña-Fouce *et al.*, 2012 ; Pessanha *et al.*, 2012).

Une corrélation entre l'augmentation de l'activité arginase des cellules mononucléées et la charge virale lors de l'infection par le VIH est également rapportée (Cloke *et al.*, en 2010). En outre, il a été montré aussi que l'activité arginase sérique est augmentée chez les patients atteints du cancer colorectal et s'abaissent après chirurgie (Graboń *et al.*, 2009).

L'induction de la voie arginase diminue la production de NO et, surtout, privilégie la production des éléments nécessaires à la croissance du parasite, ce qui constitue un mécanisme d'adaptation favorisant la prolifération du parasite. Cet apport des métabolites de l'arginase dans le développement du parasite a été confirmé *in vitro*. En effet, nous avons mis en évidence l'importance de l'ornithine dans le milieu conditionné par les macrophages. L'addition du BEC lors du conditionnement du milieu inhibe la production de ce facteur de croissance et l'addition de l'ornithine dans le milieu de culture existant favorise la prolifération du parasite. L'ornithine est donc un des facteurs de croissance du trypanosome.

Effet des facteurs d'excrétion et sécrétion parasitaires sur l'activité de l'arginase

L'induction de l'arginase ne nécessite pas un contact étroit entre les parasites et les macrophages, mais se fait par l'intermédiaire des ESF. Les ESF de *T. musculi* et de *T. lewisi* induisent l'arginase macrophagique *in vitro*. De plus, une corrélation entre l'aptitude de souches de *T. b. gambiense* à induire l'arginase et leur virulence chez l'homme a été établie (Hollzmüller *et al.*, 2008).

Dans le but d'identifier l'élément inducteur de l'activité arginase, nous avons réalisé dans notre laboratoire des anticorps monoclonaux contre différentes fractions de l'ESF de *T. b. gambiense*. Un de ces anticorps monoclonaux s'est révélé inhibiteur de l'activité arginase. Cet anticorps, le 2C12, a été utilisé pour cribler une banque génomique de *T. b. gambiense* dans le laboratoire d'Etienne Pays conduisant à l'identification d'une chaîne lourde de kinésine appartenant à la superfamille des kinésines (De Muylder *et al.*, 2013). Il s'agit d'une kinésine orpheline nommée TbKHC1, qui a été produite sous forme recombinante. La protéine recombinante de TbKHC1 induit l'activité arginase macrophagique *in vitro*. L'inoculation de *T.*

b. gambiense KO pour le gène de cette kinésine chez la souris diminue le pic de parasitémie par rapport à la souche WT.

Le 2C12 a inhibé l'activité arginase macrophagique induite par les trypanosomes du groupe *brucei*, et également par *T. musculi* ou ses ESF, ce qui a diminué la parasitémie. Il reconnaît un motif antigénique dans les ESF du *T. musculi*. Les facteurs inducteurs de l'arginase produits par *T. b. gambiense* et *T. musculi* possèderaient un épitope commun suggérant la possibilité d'une analogie structurale, qui est conservée chez ces deux espèces au moins au niveau du site inducteur de l'arginase. L'éluat obtenu après purification par chromatographie d'affinité des facteurs solubles de *T. musculi* sur colonne CNBr couplée au 2C12 est en cours d'identification par spectrométrie de masse.

Interaction facteurs solubles parasitaires et macrophage

L'utilisation des sucres (Mannose et galactose) a mis en évidence l'implication de récepteurs reconnaissant le mannose. *In vitro*, le mannose inhibe l'induction de l'arginase induite par *T. musculi* et ses ESF, et également la prolifération du parasite dans une co-culture avec les macrophages. *In vivo*, les souris traitées avec le mannose présente une faible parasitémie, et l'activité arginase macrophagique de ces souris est considérablement diminuée. Nous avons montré que les souris KO pour le récepteur mannose présente une parasitémie nettement inférieure, comparées aux souris WT. De plus, le récepteur mannose est 4 fois plus exprimé sur les macrophages des souris infestées que ceux des souris contrôles. Ces résultats mettent en exergue une corrélation entre l'expression du récepteur mannose et l'induction de l'activité arginase macrophagique.

Nous avons également observé une inhibition de l'activité arginase par le galactose. Le récepteur mannose a une affinité différente pour plusieurs carbohydrates. Certains auteurs ont montré sa haute affinité pour les résidus mannose, fucose et N-acétylgalactosamine et une affinité moyenne pour les résidus galactose, fructose, acétylglucosamine et L-rhamnose (Shepherd *et al*, 1981 ; Largent *et al*, 1984). Ceci souligne la possibilité d'inhibition du récepteur mannose par le galactose. D-mannose, et α -D-galactose inhibent le récepteur mannose tandis que le β -D-Galactose n'a pas d'effet (Soeiro *et al.*, 1999).

Le récepteur galactose macrophagique (MGL) mise en évidence y a quelques années est également impliqué dans l'activation alternative des macrophages (Raes *et al.*, 2005). Le galactose peut aussi se fixer sur d'autres récepteurs de carbohydrate.

Ainsi, la possibilité de fixation du galactose sur le récepteur mannose macrophagique (MMR) membranaire ou soluble, sa fixation sur le récepteur MGL et d'autres récepteurs lectines de type C, la particularité des isomères α et β Galactose, peuvent influencer sur l'induction de l'arginase. Ces hypothèses méritent des investigations supplémentaires pour élucider l'implication des carbohydrates.

La relation récepteur mannose et activité arginase a été démontrée dans plusieurs études récentes. *In vitro*, l'inhibition du récepteur mannose macrophagique diminue l'activité arginase et la prolifération de *Trypanosoma cruzi*. (Garrido *et al.*, 2011). Il est démontré que l'activation du récepteur mannose par le ligand lipoarabinomannane présent sur la membrane de *Mycobacterium tuberculosis* déclenche la phosphorylation du MAPK-p38 qui active la phospholipase A2 cytosolique, aboutissant à l'activation du PPAR γ , qui inhibe NF- κ B et donc la synthèse des composants pro-inflammatoires, et active l'expression de nombreux gènes anti-inflammatoires (Rajaram *et al.*, 2010). En outre, l'inhibition du récepteur mannose par un MIMP (micro domaine de la protéine intégrale de la membrane) inhibe la phosphorylation du MAPK-p38 et aussi l'expression de TLR-5 dans un modèle d'infection à *Escherichia coli* Enteropathogéniques (EPEC) (Liu *et al.*, 2012). Une interaction entre MMR et le récepteur pour la région Fc, favorise la glomérulonéphrite murine (Chavele *et al.*, 2010). En recoupant ces données de la littérature, nous pouvons nous interroger sur une coopération du MMR avec d'autres récepteurs (TLR, récepteurs pour la région Fc) pour l'induction de l'arginase.

L'expression de l'arginase I est très sensible aux agonistes de PPAR γ et PPAR δ , mais pas PPAR α . L'induction de l'arginase par les agonistes de PPAR γ , PPAR δ et l'IL-4 est inhibée dans les macrophages de souris PPAR γ et PPAR δ KO (Gallardo-Soler *et al.*, 2008).

Les voies de l'induction de l'arginase macrophagique sont très différentes et dépendent des facteurs ou de l'environnement, qui varie en fonction de modèle. Dans la bibliographie, l'induction de l'arginase-I par les lipoprotéines de haute densité (HDL) macrophagique dans un modèle d'athérosclérose, est dépendante de la signalisation IL-4 via STAT6 (Sanson *et al.*, 2013). Une autre étude met en évidence l'induction de la voie arginase par activation du récepteur AdipoR2 via IL-4 / STAT6 (Mandal *et al.*, 2011). Dans une leishmaniose murine à *Leishmania donovani*, l'IL-10 via STAT3 induit l'expression de l'IL-4Ra qui activé par IL-4 induit l'arginase via STAT6 et C/EBP- β (Biswas *et al.*, 2011). L'inhibition de PD-1 et de CTL-4 réduit considérablement l'activité arginase 1 induite par les facteurs associés au tumeur (Liu *et al.*, 2008). La fixation du ligand peut dimériser ou oligomériser les récepteurs mannose (Lai *et al.*, 2009), ou implique l'activation d'autres récepteurs. Dans le modèle à *T. b. gambiense*, le

TbKHC1 se fixe sur le SIGNR-1 (De Myulder *et al.*, 2013), avec une possibilité de reconnaissance de MMR du fait d'un rapprochement entre la structure des ligands de ces deux récepteurs et il n'est pas exclu que le facteur inducteur de l'arginase sécrété par *T. musculi* se fixerait également sur le SIGNR1. Une autre hypothèse est la possibilité que le facteur (kinésine) du *T. musculi* se fixerait sur le récepteur mannose et ferait intervenir d'autres récepteurs lectine de type C pour aboutir à l'induction de l'arginase macrophagique. Ce facteur conservé activerait un récepteur (MMR) également conservé chez l'hôte, d'où la conservation de ce mécanisme d'immunomodulation. La voie d'induction de ces deux parasites peut aussi être différente car *T. b. gambiense* évolue d'une manière aiguë chez la souris et présente une charge parasitaire très élevée en quelques jours.

Implication thérapeutique du mannose

Le mannose, non toxique, actif *per os*, est utilisé pendant de longues durées avec succès dans certains déficits enzymatiques chez l'homme (de Lonlay *et al.*, 1999). Il pourrait être utilisé dans la THA avec les mêmes posologies et le même protocole d'administration. Il pourrait également être associé à d'autres principes actifs. Les médicaments de la THA ont la même efficacité sur *T. lewisi*, agent de trypanosomose atypique. Ainsi, le DFMO, inhibiteur de l'arginase mais surtout de l'ornithine décarboxylase, est actif sur les deux parasites. Son association avec le nifurtimox, (donneur de NO) potentialise son effet et facilite son administration. Cette association (NECT) est devenue le traitement de référence chez les patients au stade 2 de la THA. Nous avons montré l'efficacité du fexinidazole *in vitro* et *in vivo* sur *T. lewisi* et *in vitro* sur *T. b. gambiense*. Le mannose pourrait être associé au fexinidazole, également actif *per os*. Le développement des associations est encouragé dans le traitement des maladies parasitaires, pour diminuer le risque d'émergence de résistance au traitement. De plus, des réductions du coût et des posologies sont également possibles.

Etat d'activation des macrophages

L'induction de l'activité arginase et l'expression du récepteur mannose sont caractéristiques de l'activation alternative des macrophages. Cet état d'activation est subdivisé en plusieurs phénotypes. L'IL-10 et TGF- β sont impliqués dans l'activation des macrophages par TbKHC1 (De Myulder *et al.*, 2013), par contre, l'IL-4 n'est pas impliqué dans cette voie. Les macrophages murins infestés par *Coxiella burnetii* (bactérie à l'origine de la fièvre Q) présentent un phénotype M2 associés à l'IL-10, le TGF- β , le récepteur mannose et l'arginase-I (Amara *et al.*, 2012). L'évaluation des marqueurs d'activation alternative par une approche de puces à haut

débit (Mehraj *et al.*, 2013) permettra d'identifier les sous populations des macrophages M2, impliqués dans les trypanosomoses et de déterminer la chronologie de la séquence d'évènements aboutissant à l'induction de l'arginase.

Conclusion et Perspectives

Une nouvelle voie d'immunomodulation, induite par les trypanosomes chez leurs hôtes, a été caractérisée, favorisant la multiplication de *Trypanosoma musculi* chez son hôte naturel, la souris.

Pour éviter la réponse cytotoxique M1 des macrophages et bénéficier de leur réponse M2, associée à la synthèse de facteur de croissance, les parasites induisent l'arginase. L'induction de l'arginase, réponse M2 caractéristique, permet la production de L-ornithine, facteur essentiel de croissance parasitaire, à l'origine de la voie métabolique des polyamines et de la trypanothione, indispensables aux parasites. Ce modèle d'activation M2 peut permettre une meilleure connaissance des différents phénotypes d'activation alternative des macrophages.

Cette voie d'immunomodulation mise en évidence dans une trypanosomose évoluant chez son hôte naturel pourrait être conservée, et même être impliquée dans la THA. En effet, une augmentation de l'arginase est retrouvée dans le sérum de patients trypanosomés ; elle se normalise après traitement efficace, indiquant son intérêt potentiel dans le suivi des sujets traités. De plus, *T. b. gambiense* induit l'arginase au niveau des macrophages de souris, mais aussi des leucocytes humains. Il faut également noter que *T. lewisi* induit également l'arginase au niveau des macrophages de souris.

Au cours de leur co-évolution chez leurs hôtes, les trypanosomes extracellulaires ont sélectionné un procédé favorisant leur croissance, l'induction de l'arginase, grâce à des ESF. La structure du site inducteur de ce(s) facteur(s) est probablement conservée. Un anticorps monoclonal dirigé contre le facteur soluble de *T. b. gambiense* induisant l'arginase, la kinésine, bloque également l'activité inductrice de *T. musculi in vitro* et, fait très intéressant, *in vivo*. Il reconnaît également les ESF de *T. lewisi*. Quel pourrait être l'intérêt de ce(s) facteurs solubles dans une approche vaccinale ? La partie C-terminale de la chaîne lourde, distincte des autres kinésines, pourrait être utilisée au départ, puis ensuite, une approche peptidique pourrait être réalisée.

Des anticorps anti-kinésine ont été mis en évidence chez les sujets trypanosomés et les sujets séropositifs mais parasitologiquement négatifs (plusieurs PCR négative). L'intérêt de ces anticorps dans le diagnostic, suivi, pronostic, est prévu prochainement.

Ces facteurs inducteurs se lient à des récepteurs de la membrane des macrophages. L'utilisation de sucres a montré l'intervention de récepteurs reconnaissant en particulier le mannose. *In vitro*, l'addition de mannose bloque l'induction de l'arginase par les parasites et leurs ESF. Chez la souris infestée par *T. musculi*, l'injection de mannose diminue considérablement la parasitémie, qui est également très réduite chez les souris *Mrc1*^{-/-}.

Le rôle de ces récepteurs, très conservés au cours de l'évolution, peut représenter une nouvelle approche thérapeutique. En effet, au niveau des trypanosomes, la diminution de la captation des médicaments est une cause importante de résistance au traitement. Des mutations au niveau des gènes des différents transporteurs membranaires impliqués ont été observées. L'utilisation de molécules ciblant ces récepteurs peut donc s'avérer une alternative et/ou un complément thérapeutique intéressant.

Bibliographie

Adapala N, Chan MM. (2008) Long-term use of an antiinflammatory, curcumin, suppressed type 1 immunity and exacerbated visceral leishmaniasis in a chronic experimental model. *Lab Invest.* 88:1329-39.

Acosta-Serrano A, Vassella E, Liniger M, Kunz Renggli C, Brun R, Roditi I, Englund PT. (2001) The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:1513-8.

Alcover A, Alarcón B. (2000) Internalization and intracellular fate of TCR-CD3 complexes. *Crit Rev Immunol.* 20:325-46.

Amin DN, Vodnala SK, Masocha W, Sun B, Kristensson K, Rottenberg ME. (2012) Distinct Toll-like receptor signals regulate cerebral parasite load and interferon α/β and tumor necrosis factor α -dependent T-cell infiltration in the brains of *Trypanosoma brucei*-infected mice. *J Infect Dis.* 205 :320-32.

Amrouni D, Gautier-Sauvigné S, Meiller A, Vincendeau P, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R (2010). Cerebral and peripheral changes occurring in nitric oxide (NO) synthesis in a rat model of sleeping sickness: identification of brain iNOS expressing cells. *PLoS One* 5:e9211.

Anderson NE, Mubanga J, Fevre EM, Picozzi K, Eisler MC, Thomas R, Welburn SC.(2011) Characterisation of the wildlife reservoir community for human and animal trypanosomiasis in the Luangwa Valley, Zambia. *PLoS Negl Trop Dis.* 5:e1211.

Bakhiet M, Mix E, Kristensson K, Wigzell H, Olsson T. (1993) T cell activation by a *Trypanosoma brucei* brucei-derived lymphocyte triggering factor is dependent on tyrosine protein kinases but not on protein kinase C and A. *Eur J Immunol.* 23 :1535-9.

Bakhiet M, Jansson L, Büscher P, Holmdahl R, Kristensson K, Olsson T.(1996) Control of parasitemia and survival during *Trypanosoma brucei brucei* infection is related to strain-dependent ability to produce IL-4. *J Immunol.*157:3518-26.

Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM.(2012) Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 181:85-93.

Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Netto M, Abrahamssohn Ide A.(2002) *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* 4 :23-9.

Baetselier PD, Namangala B, Noël W, Brys L, Pays E, Beschin A.(2001) Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *Int J Parasitol.* 31:575-87.

Bagnost T, Ma L, da Silva RF, Rezakhaniha R, Houdayer C, Stergiopoulos N, André C, Guillaume Y, Berthelot A, Demougeot C.(2010) Cardiovascular effects of arginase inhibition in spontaneously hypertensive rats with fully developed hypertension. *Cardiovasc Res.* ;87 :569-77.

Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, Lennard NJ, Caler E, Hamlin NE, Haas B, Böhme U, Hannick L, Aslett MA, Shallom J, Marcello L, Hou L, Wickstead B, Alsmark UC, Arrowsmith C, Atkin RJ, Barron AJ, Bringaud F *et al.*(2005) The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. (*Science.* 309 : 416-22.

Biedermann T, Röcken M, Carballido JM.(2004) TH1 and TH2 lymphocyte development and regulation of TH cell-mediated immune responses of the skin. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 9:5-14. Review.

Bilengue CM, Meso VK, Louis FJ, Lucas P.(2001) Human African trypanosomiasis in the urban milieu: the example of Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, in 1998 and 1999].*Med Trop* 61 :445-8.

Biswas A, Bhattacharya A, Kar S, Das PK.(2011) Expression of IL-10-triggered STAT3-dependent IL-4R α is required for induction of arginase 1 in visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol.*41 :992-1003.

Blasius AL, Beutler B. (2010) Intracellular toll-like receptors. *Immunity.*32 :305-15.

Bouteille B, Mpandzou G, Cespuglio R, Ngampo S, Peeling RW, Vincendeau P, Buguet A.(2010) Cerebrospinal fluid B lymphocyte identification for diagnosis and follow-up in human African trypanosomiasis in the field. *Trop Med Int Health.* 4:454-61.

Boucher JL, Custot J, Vadon S, Delaforge M, Lepoivre M, Tenu JP, Yapo A, Mansuy D.(1994) N omega-hydroxyl-L-arginine, an intermediate in the L-arginine to nitric oxide pathway, is a strong inhibitor of liver and macrophage arginase. *Biochem Biophys Res Commun.* 203 :1614-21.

Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. *Lancet* 2010; 375: 148–59.

Bringaud F, Barrett MP, Zilberstein D.(2012) Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci (Landmark Ed).* 17:349-74.

Bromley, S. K., A. Iaboni, S. J. Davis, A. Whitty, J. M. Green, A. S. Shaw, A. Weiss, and M. L. Dustin. 2001. The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.* 2:1159.

Buguet A, Burlet S, Auzelle F, Montmayeur A, Jouvet M, Cespuglio R (1996) Action duality of nitrogen oxide (NO) in experimental African trypanosomiasis *C R Acad Sci III.* 319:201-7.

Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, Cespuglio R, Vincendeau P, Radomski MW, Dumas M.(2001) The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. *Sleep Med Rev.* 5 :139-153.

Butcher BA, Fox BA, Rommereim LM, Kim SG, Maurer KJ, Yarovinsky F, Herbert DR, Bzik DJ, Denkers EY.(2011) *Toxoplasma gondii* rhoptry kinase ROP16 activates STAT3 and STAT6

resulting in cytokine inhibition and arginase-1-dependent growth control. PLoS Pathog. 7:e1002236.

Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ.(1986) Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular Chlamydia psittaci replication in T24 cells. Infect Immun. 2 :347-51.

Cama, E., D. M. Colleluori, et al. (2003). "Human arginase II: crystal structure and physiological role in male and female sexual arousal." Biochemistry 42: 8445-51.

Cavdar Z, Onvural B, Guner G. (2003), Arginase in patients with breast cancer, Clin Chim Acta. (1-2):171-2.

Cederbaum, S. D., H. Yu, et al. (2004). "Arginases I and II: do their functions overlap?" Mol Genet Metab 81 Suppl 1: S38-44.

Cerami A, Beutler B.(1988) the role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. Immunol Today. 9 :28-31.

Chan MM, Adapala N, Chen C.(2012) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ -Mediated Polarization of Macrophages in Leishmania Infection. PPAR Res. 2012;2012:796235.

Chang CI, Liao JC, Kuo L.(1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. Am J Physiol. 274 :H342-8.

Chimelli L, Scaravilli F.(1997) Trypanosomiasis. Brain Pathol. 9-611.

Chavele KM, Martinez-Pomares L, Domin J, Pemberton S, Haslam SM, Dell A, Cook HT, Pusey CD, Gordon S, Salama AD.(2010) Mannose receptor interacts with Fc receptors and is critical for the development of crescentic glomerulonephritis in mice. J Clin Invest. 2010 120:1469-78.

Chimelli L, Scaravilli F. (1997) Trypanosomiasis. Brain Pathol. 7:599-611.

Clerinx J, Vlieghe E, Asselman V, Van de Casteele S, Maes MB, Lejon V. (2012) Human African trypanosomiasis in a Belgian traveller returning from the Masai Mara area, Kenya, Euro Surveill.8; 17(10).

Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P (2012) Characterization of a Novel Population of Low-Density Granulocytes Associated with Disease Severity in HIV-1 Infection, PLoS One. 7:e48939.

Coccia EM, Stellacci E, Marziali G, Weiss G, Battistini A.(2000) IFN-gamma and IL-4 differently regulate inducible NO synthase gene expression through IRF-1 modulation. Int Immunol. 12: 977-85.

Coleman JW. (2001) Nitric oxide in immunity and inflammation. Int Immunopharmacol. 1:1397-406.

Cox JD, Kim NN, Traish AM, Christianson DW. (1999) Arginase-boronic acid complex highlights a physiological role in erectile function. Nat Struct Biol. 6:1043-7.

Christodoulopoulos P, Cameron L, Nakamura Y, Lemièrre C, Muro S, Dugas M, Boulet LP, Laviolette M, Olivenstein R, Hamid Q.(2001) TH2 cytokine-associated transcription factors in atopic and nonatopic asthma: evidence for differential signal transducer and activator of transcription 6 expression. *J Allergy Clin Immunol.* 107:586-91.

D'Alessandro P.A. 1970. Non pathogenic trypanosomes of rodents. The humoral factors of immunity. In *Immunity to parasitic animals*, Vol. 2 Editeurs Jackson G.J, Herman R., Singer I., P. 691. Appleton-Century Crofts, New-York.

Dan JM, Kelly RM, Lee CK, Levitz SM.(2008) Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection. *Infect Immun.*76:2362-7.

Daulouède, S., Bouteille, B., Moynet, D., Baetselier, P.D., Courtois, P., Lemesre, J.L., Buguet, A., Cespuglio, A., and Vincendeau, P., (2001) Human Macrophage Tumor Necrosis Factor (TNF)- α Production Induced by *Trypanosoma brucei gambiense* and the Role of TNF- α in Parasite control, *The Journal of Infectious Diseases*, 183:988-91.

Davel LE, Jasnis MA, de la Torre E, Gotoh T, Diamant M, Magenta G, Sacerdote de Lustig E, Sales ME.(2002) Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages. *FEBS Lett.* 532:216-20.

Deane M.P. 1969. On the life cycle of trypanosomes of the lewisi group and their relationship to other mammalian trypanosomes. *Rev. Inst. Med. Trop., Sao Paola*, 11, 34.

Deborggraeve S, Koffi M, Jamonneau V, Bonsu FA, Queyson R, et al. (2008) Molecular analysis of archived blood slides reveals an atypical human *Trypanosoma* infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61: 428–433.

Denkers EY, Bzik DJ, Fox BA, Butcher BA.(2012) An inside job: hacking into Janus kinase/signal transducer and activator of transcription signaling cascades by the intracellular protozoan *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun.* 80 :476-82.

Devine DV, Falk RJ, Balber AE.(1986) Restriction of the alternative pathway of human complement by intact *Trypanosoma brucei* subsp. *gambiense*. *Infect Immun.* 52 :223-9.

Doke PP, Kar A (2011) A fatal case of *Trypanosoma lewisi* in Maharashtra, India. *Ann Trop Med Public Health* 4: 91–95. doi: 10.4103/1755-6783.85759.

Donelson JE, Hill KL, El-Sayed NM. (1998) Multiple mechanisms of immune evasion by African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 91 :51-66.

Donovan MJ, Tripathi V, Favila MA, Geraci NS, Lange MC, Ballhorn W, McDowell MA.(2012) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) induced by *Leishmania* infection of human dendritic cells. *Parasite Immunol.* 34 :464-72.

Dormeyer M, Reckenfelderbäumer N, Ludemann H, Krauth-Siegel RL.(2001) Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 6;276 :10602-6.

Duleu S, Vincendeau P, Courtois P, Semballa S, Lagroye I, Daulouède S, Boucher JL, Wilson KT, Veyret B, Gobert AP. (2004) Mouse Strain Susceptibility to Trypanosome Infection: An Arginase-Dependent Effect, *J Immunol.* 172 :6298-303.

Dulgerian LR, Garrido VV, Stempin CC, Cerbán FM.(2011) Programmed death ligand 2 regulates arginase induction and modifies *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages during murine experimental infection. *Immunology.* 133 :29-40.

Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles MP, Grimaud L, Lenoir J, Preisser L, Anegon I, Catala L, Ifrah N, Descamps P, Gamelin E, Gascan H, Hebbar M, Jeannin P.(2007) Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells.*Blood.* 110 :4319-30.

Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, Ponsoda S, Delneste Y, Hebbar M, Jeannin P.(2009) Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int J Cancer.* 125 :367-73.

Dumas M, Bisser S, 1999. Clinical aspects of human African trypanosomiasis (Chapitre 13)
In: “Progress in human African Trypanosomiasis, sleeping sickness”, (Eds) Dumas M, Bouteille B, Buguet A. Springer-Verlag, France, pp 214-233.

Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI.(2001) Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis.*Circulation.* 103 :1121-7.

Ehrchen J, Helming L, Varga G, Pasche B, Loser K, Gunzer M, Sunderkötter C, Sorg C, Roth J, Lengeling A.(2007) Vitamin D receptor signaling contributes to susceptibility to infection with *Leishmania major*. *FASEB J.* 2007 21 :3208-18.

El Kasmi KC, Qualls JE, Pesce JT, Smith AM, Thompson RW, Henao-Tamayo M, Basaraba RJ, König T, Schleicher U, Koo MS, Kaplan G, Fitzgerald KA, Tuomanen EI, Orme IM, Kanneganti TD, Bogdan C, Wynn TA, Murray PJ.(2008) Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens. *Nat Immunol.* 9:1399-406.

Elnekave K, Siman-Tov R, Ankri S. (2003) Consumption of L-arginine mediated by *Entamoeba histolytica* L-arginase (EhArg) inhibits amoebicidal activity and nitric oxide production by activated macrophages. *Parasite Immunol.* 25:597-608.

Engering AJ, Cella M, Fluitsma DM, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J.(1997) Mannose receptor mediated antigen uptake and presentation in human dendritic cells. *Adv Exp Med Biol.* 417:183-7.

Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J.(1997) The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol.* 27:2417-25.

Enyaru JC, Matovu E, Nerima B, Akol M, Sebikali C. (2006) Detection of *T.b. rhodesiense* trypanosomes in humans and domestic animals in south east Uganda by amplification of serum resistance-associated gene. *Ann N Y Acad Sci.* 1081:311-9.

Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A.(1985) Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 227 :1485-7.

Fitzpatrick JM, Fuentes JM, Chalmers IW, Wynn TA, Modolell M, Hoffmann KF, Hesse M. (2009) *Schistosoma mansoni* arginase shares functional similarities with human orthologs but depends upon disulphide bridges for enzymatic activity. *Int J Parasitol*. 39 :267-79.

Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, Garvey EP.(1993) Selective inhibition of constitutive nitric oxide synthase by L-NG-nitroarginine. *Biochemistry*.32 :8512-7.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4 (+)CD25(+) regulatory T cells. *Nature Immunology*. 2003; 4:330-336.

Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olagner D, Béraud M, Martin-Blondel G, Linas MD, Auwerx J, Coste A, Pipy B.(2010) PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 6(1).

Gallardo-Soler A, Gómez-Nieto C, Campo ML, Marathe C, Tontonoz P, Castrillo A, Corraliza I.(2008) Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol*. 22 :1394-402.

Garrido VV, Dulgerian LR, Stempin CC, Cerbán FM., (2011) The increase in mannose receptor recycling favors arginase induction and *Trypanosoma cruzi* survival in macrophages. *Int J Biol Sci*. 7:1257-72.

Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD *et al*. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 445:771-775.

Gill BS (1977) Trypanosomes and trypanosomiasis of Indian livestock. New Delhi: Indian Council of Agricultural Research Report. p 36.

Gray MJ, Poljakovic M, Kepka-Lenhart D, Morris SM Jr.(2005) Induction of arginase I transcription by IL-4 requires a composite DNA response element for STAT6 and C/EBP β . *Gene*. 353 :98-106.

Girard M, Bisser S, Buscher P, Bouteille B, Preud'homme JL, Jauberteau MO, 2000. Crossreactivity of anti-galactocerebroside autoantibodies with a *Trypanosoma brucei* proteolipidic epitope. *Clin Exp Immunol*. 119, 516-22.

Girard M, Giraud S, Courtioux B, Jauberteau-Marchan MO, Bouteille B.(2005) Endothelial cell activation in the presence of African trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol*. 139:41-9.

Gleissner CA, Shaked I, Little KM, Ley K. (2010) CXC chemokine ligand 4 induces a unique transcriptome in monocyte-derived macrophages. *J Immunol*.184 :4810-8.

Gleissner CA, Shaked I, Erbel C, Böckler D, Katus HA, Ley K.(2010) CXCL4 downregulates the atheroprotective hemoglobin receptor CD163 in human macrophages. *Circ Res*.106 :203-11.

Gleissner CA. (2012) Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis. *Front Physiol.*13; 3:1.

Gómez-Rodríguez J, Stijlemans B, De Muylder G, Korf H, Brys L, Berberof M, Darji A, Pays E, De Baetselier P, Beschin A.(2009) Identification of a parasitic immunomodulatory protein triggering the development of suppressive M1 macrophages during African trypanosomiasis. *J Infect Dis.* 200 :1849-60.

Gobert AP, Semballa S, Daulouede S, Lesthelle S, Taxile M, Veyret B, Vincendeau P.(1998) Murine macrophages use oxygen- and nitric oxide-dependent mechanisms to synthesize S-nitroso-albumin and to kill extracellular trypanosomes. *Infect Immun.* 66 :4068-72.

Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P. (2000). L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun.* 68 :4653-7.

Gökmen SS, Aygit AC, Ayhan MS, Yorulmaz F, Gülen S. (2001) Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. *J Lab Clin Med.*137 :340-4.

Goerdts S, Politz O, Schledzowski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Klemke CD, Dippel E, Kodelja V, Orfanos CE.(1999) Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology.* 67 :222-6.

Gordon S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.*3 :23-35.

Graboń W, Mielczarek-Puta M, Chrzanowska A, Barańczyk-Kuźma A.(2009) L-arginine as a factor increasing arginase significance in diagnosis of primary and metastatic colorectal cancer.*Clin Biochem.*42(4-5):353-7.

Grakoui, A., S. K. Bromley, C. Sumen, M. M. Davis, A. S. Shaw, P. M. Allen, and M. L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285:221.

Greenwood BM, Whittle HC.(1973) Cerebrospinal-fluid IgM in patients with sleeping-sickness. *Lancet.* 2 :525-7.

Grohmann U, Fallarino F, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Fioretti MC, Puccetti P.(2003) Tryptophan catabolism in nonobese diabetic mice. *Adv Exp Med Biol.* 527:47-54.

Guilbert B, Dighiero G, Avrameas S.(1982) Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. I. Detection, isolation and characterization. *J Immunol.* 128 :2779-87.

Hager KM, Pierce MA, Moore DR, Tytler EM, Esko JD, Hajduk SL. (1994) Endocytosis of a cytotoxic human high density lipoprotein results in disruption of acidic intracellular vesicles and subsequent killing of African trypanosomes. *J Cell Biol.*126 :155-67.

Hajishengallis G, Lambris JD.(2011) Microbial manipulation of receptor crosstalk in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 11 :187-200.

Hamadien M, Lycke N, Bakhiet M.(1999) Induction of the trypanosome lymphocyte-triggering factor (TLTF) and neutralizing antibodies to the TLTF in experimental african trypanosomiasis. Immunology. 96 :606-11.

Hamadien M, Bakhiet M, Harris RA.(2000) Interferon-gamma induces secretion of trypanosome lymphocyte triggering factor via tyrosine protein kinases. Parasitology.120 :281-7.

Hartl G., Chaib F., Glenn T., Tarik J.,2013, OMS, Aide-mémoire N°259 Juin.

Hayaishi O and Matsumura H. (1995). Prostaglandins and sleep. Adv Neuroimmunol 5: 211–216,

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, *et al.* (2001) Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. J Immunol 167: 6533–6544.

Heffernan D, Dudley B, McNeil PL, Howdieshell TR.(2006) Local arginine supplementation results in sustained wound nitric oxide production and reductions in vascular endothelial growth factor expression and granulation tissue formation. J Surg Res. 133:46-54.

Holzmuller P, Biron DG, Courtois P, Koffi M, Bras-Gonçalves R, Daulouède S, Solano P, Cuny G, Vincendeau P, Jamonneau V.(2008) 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; 10:79-86.

Horn D, Barry JD.(2005) The central roles of telomeres and subtelomeres in antigenic variation in African trypanosomes. Chromosome 13 :525-33.

Hristodorov D, Mladenov R, Huhn M, Barth S, Thepen T. (2012) Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. Toxins (Basel). :676-94.

Huang X, Stone DK, Yu F, Zeng Y, Gendelman HE. (2010) Functional Proteomic Analysis for Regulatory T Cell Surveillance of the HIV-1-Infected Macrophage. Journal of Proteome Research 9 : 6759–6773 6759.

Hunter CA, Sibley LD.(2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. Nat Rev Microbiol. 10 :766-78.

Ilies M, Di Costanzo L, Dowling DP, Thorn KJ, Christianson DW.(2011) Binding of α,α -disubstituted amino acids to arginase suggests new avenues for inhibitor design. J Med Chem. 54 :5432-43.

Ilemobade AA, Adegboye DS, Onoviran O, Chima JC. (1982) Parasite Immunol.4:273-82.

Iwasaki A, Medzhitov R.(2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. Nat Immunol. 5 : 987-95.

Johnson PD (1933) A case of infection by *Trypanosoma lewisi* in a child. Trans R Soc Trop Med Hyg 26: 467–468.

Joshi PP, Shegokar V, Powar S, Herder S, Katti R, et al. (2005) Human Trypanosomiasis caused by *Trypanosoma evansi* in India: the first case report. *Am J Trop Med Hyg* 73: 491–495.

Kadl A, Meher AK, Sharma PR, Lee MY, Doran AC, Johnstone SR, Elliott MR, Gruber F, Han J, Chen W, Kensler T, Ravichandran KS, Isakson BE, Wamhoff BR, Leitinger N. (2010) Identification of a Novel Macrophage Phenotype That Develops in Response to Atherogenic Phospholipids via Nrf2, *Circ Res*.107:737-746.

Kang SM, Tang Q, Bluestone JA. CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Transplantation: Progress, Challenges and Prospects. *American Journal of Transplantation*.7:1457-1463.

Kanyo ZF, Scolnick LR, Ash DE, Christianson DW. (1996) Structure of a unique binuclear manganese cluster in arginase. *Nature*. 383 :554-7.

Kapas L, Fang J, and Krueger JM.(1994) Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits rat sleep. *Brain Res* 664: 189–196.

Kaufmann SH. (2007) The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat Rev Microbiol*. 5 :491-504.

Kawai T, Akira S.(2011) Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. ; 34 :637-50.

Kennedy PG. (2013) Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Lancet Neurol*. 12 :186-94.

Khallou-Laschet J, Varthaman A, Fornasa G, Compain C, Gaston AT, Clement M, Dussiot M, Levillain O, Graff-Dubois S, Nicoletti A, Caligiuri G.(2010) Macrophage plasticity in experimental atherosclerosis. *PLoS One*. 5 :e8852.

Kim JM, Rasmussen JP, Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007;8:191-197.

Kodelja V, Müller C, Politz O, Hakij N, Orfanos CE, Goerdts S.(1998) Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *J Immunol*.; 160 :1411-8.

Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H.(2003) The parasite-specific trypanothione metabolism of *trypanosoma* and *leishmania*. *Biol Chem*. 384 :539-49.

Kropf P, Baud D, Marshall SE, Munder M, Mosley A, Fuentes JM, Bangham CR, Taylor GP, Herath S, Choi BS, Soler G, Teoh T, Modolell M, Müller I. (2007) Arginase activity mediates reversible T cell hyporesponsiveness in human pregnancy, *Eur. J. Immunol*. 37: 935–945.

Krueger JM, Majde JA, and Obál F. (2003) Sleep in host defence. *Brain Behav Immun* 17: S41–S47.

Lacerda DI, Cysne-Finkelstein L, Nunes MP, De-Luca PM, Genestra Mda S, Leon LL, Berrêdo-Pinho M, Mendonça-Lima L, Matos DC, Medeiros MA, Mendonça SC.(2012) Kinetoplastid

membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. Mem Inst Oswaldo Cruz. 107:238-45.

Largent, B. L., Walton, K. M., Hoppe, C. A., Lee, Y. C., and Schnaar, R. L. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 1764–1769.

Lee RT, Ichikawa Y, Fay M, Drickamer K, Shao MC, Lee YC. (1991) Ligand-binding characteristics of rat serum-type mannose-binding protein (MBP-A). Homology of binding site architecture with mammalian and chicken hepatic lectins. *J Biol Chem.* 266 :4810-5.

Lee RT, Hsu TL, Huang SK, Hsieh SL, Wong CH, Lee YC. (2011) Survey of immune-related, mannose/fucose-binding C-type lectin receptors reveals widely divergent sugar-binding specificities. *Glycobiology.* 21 :512-20.

Liang C, Chen SL, Wang M, Zhai WJ, Zhou Z, Pang AM, Feng SZ, Han MZ.(2013) [Synergistic immunomodulatory effects of interferon-gamma and bone marrow mesenchymal stem cells]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2013 Mar;34 :213-6.

Li H, Meininger CJ, Hawker JR Jr, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, Morris SM Jr, Wu G.(2001) Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 280 :E75-82.

Li H, Meininger CJ, Kelly KA, Hawker JR Jr, Morris SM Jr, Wu G. (2002) Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282 :R64-9.

Li Z, Zhao ZJ, Zhu XQ, Ren QS, Nie FF, Gao JM, Gao XJ, Yang TB, Zhou WL, Shen JL, Wang Y, Lu FL, Chen XG, Hide G, Ayala FJ, Lun ZR. (2012).Differences in iNOS and Arginase Expression and Activity in the Macrophages of Rats Are Responsible for the Resistance against *T. gondii* Infection, *PLoS One.* 7(4):e35834.

Liechtenstein T, Dufait I, Bricogne C, Lanna A, Pen J (2012) PDL1/ PD-1 Co-Stimulation, a Brake for T Cell Activation and a T cell Differentiation Signal. *J Clin Cell Immunol* S12:006.

Liao X, Sharma N, Kapadia F, Zhou G, Lu Y, Hong H, Paruchuri K, Mahabeleshwar GH, Dalmas E, Venteclef N, Flask CA, Kim J, Doreian BW, Lu KQ, Kaestner KH, Hamik A, Clément K, Jain MK.(2011) Krüppel-like factor 4 regulates macrophage polarization. *J Clin Invest.* 121 :2736-49.

Liu Y, Yu Y, Yang S, Zeng B, Zhang Z, Jiao G, Zhang Y, Cai L, Yang R.(2008) Regulation of arginase I activity and expression by both PD-1 and CTLA-4 on the myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 58 :687-97.

Lozach PY, Amara A, Bartosch B, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Cosset FL, Altmeyer R.(2004) C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem.* 279:32035-45.

Louis F.J, Buscher P., Lejon, V. (2001) Le diagnostic de la Trypanosomiase Humaine Africaine en 2001. *Med. Trop.* 61 : 340-346.

Lundkvist GB, Kristensson K, Bentivoglio M.(2004) Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology (Bethesda)* 19:198-206.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS.(2000) *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*. 102 :3003-8.

Martínez-Pomares L, Mahoney JA, Káposzta R, Linehan SA, Stahl PD, Gordon S.(1998) A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum. *J Biol Chem*. 273 :23376-80.

Magez S, Geuskens M, Beschin A, del Favero H, Verschueren H, Lucas R, Pays E, de Baetselier P. (1997) Specific uptake of tumor necrosis factor-alpha is involved in growth control of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*. 137 :715-27.

Magez S, Radwanska M, Beschin A, Sekikawa K, De Baetselier P.(1999) Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect Immun*.67 :3128-32.

Machado FS, Martins GA, Aliberti JC, Mestriner FL, Cunha FQ, Silva JS. (2000) *Trypanosoma cruzi*-Infected Cardiomyocytes Produce Chemokines and Cytokines That Trigger Potent Nitric Oxide-Dependent Trypanocidal Activity, *Circulation*.102:3003-3008.

Malvy D, Chappuis F. Sleeping sickness. *Clin Microbiol Infect*. 7:986-95.

Mandal P, Pratt BT, Barnes M, McMullen MR, Nagy LE.(2011) Molecular mechanism for adiponectin-dependent M2 macrophage polarization: link between the metabolic and innate immune activity of full-length adiponectin. *J Biol Chem*. 286 :13460-9.

Melo MB, Jensen KD, Saeij JP.(2011) *Toxoplasma gondii* effectors are master regulators of the inflammatory response. *Trends Parasitol*. 27:487-95.

Manta B, Comini M, Medeiros A, Hugo M, Trujillo M, Radi R.(2013) Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta*. 1830 :3199-216.

Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A.(2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 23:549-55.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M.(2004), The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization, *Trends Immunol*. 12 :677-86.

Mantovani A, Garlanda C, Locati M, Rodriguez TV, Feo SG, Savino B, Vecchi A.(2007) Regulatory pathways in inflammation. *Autoimmun* 7 :8-11.

Mantovani A, Sica A. (2010) Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol*. 22 :231-7.

Mariño K, Güther ML, Wernimont AK, Amani M, Hui R, Ferguson MA. (2010) Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of *Trypanosoma brucei* UDP-glucose pyrophosphorylase. *Glycobiology*. 20:1619-30.

Martinez FO, Helming L, Gordon S.(2009)Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol*. ; 27: 451-83.

- McGrath MS, Kodelja V. (1999) Balanced macrophage activation hypothesis: a biological model for development of drugs targeted at macrophage functional states. *Pathobiology*. 67: 277-81.
- McKenzie EJ, Taylor PR, Stillion RJ, Lucas AD, Harris J, Gordon S, Martinez-Pomares L. (2007) Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells. *J Immunol*. 178 :4975-83.
- Mellor AL, Munn DH.(2004) IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol*. 4 :762-74.
- Molina-Portela MP, Samanovic M, Raper J.(2008) Distinct roles of apolipoprotein components within the trypanosome lytic factor complex revealed in a novel transgenic mouse model. *J Exp Med*. 205 :1721-8.
- Molyneux DH, Pentreath V, Doua F, 1996. African Trypanosomiasis in man. In: Manson's Tropical Diseases, (Ed) Cook GC. WB Saunders Company Ltd, London, UK, pp 1183-1196.
- Mosmann TR, Bond MW, Coffman RL, Ohara J, Paul WE.(1986) T-cell and mast cell lines respond to B-cell stimulatory factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83 :5654-8.
- Mosmann TR, Yokota T, Kastelein R, Zurawski SM, Arai N, Takebe Y.(1987) Species-specificity of T cell stimulating activities of IL 2 and BSF-1 (IL 4): comparison of normal and recombinant, mouse and human IL 2 and BSF-1 (IL 4). *J Immunol*.138 :1813-6.
- Mosser DM. (2003)The many faces of macrophage activation, *J Leukoc Biol*. 2003 73 :209-12.
- Mosser DM, Edwards JP.(2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 8:958-69.
- Murakami Y, Hoshi M, Hara A, Takemura M, Arioka Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Funato T, Seishima M, Saito K (2012) Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine*. :245-51.
- Müller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL.(2003) Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol*. ;19:320-8.
- Müller IB, Walter RD, Wrenger C (2005) Structural metal dependency of the arginase from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Biol Chem*. 2:117-26.
- Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M (1999), Th1/Th2-Regulated Expression of Arginase Isoforms in Murine Macrophages and Dendritic Cells *J Immunol*. 163 :3771-7.
- Murakami Y, Hoshi M, Hara A, Takemura M, Arioka Y, Yamamoto Y, Matsunami H, Funato T, Seishima M, Saito K.(2012) Inhibition of increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity attenuates *Toxoplasma gondii* replication in the lung during acute infection. *Cytokine*. 59 :245-51.
- Munder M. (2009) Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *British Journal of Pharmacology* 158, 638–651.

Namangala B, De Baetselier P, Noël W, Brys L, Beschin A.(2001)Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomosis, *J. Leukoc. Biol.* 69: 387–396.

Namangala B. (2011) Contribution of innate immune responses towards resistance to African trypanosome infections. *Scand J Immunol.* 75 :5-15.

Napper CE, Dyson MH, Taylor ME.(2001) An extended conformation of the macrophage mannose receptor. *J Biol Chem.*276 :14759-66.

Nare B, Wring S, Bacchi C, Beaudet B, Bowling T, Brun R, Chen D, Ding C, Freund Y, Gaukel E, Hussain A, Jarnagin K, Jenks M, Kaiser M, Mercer L, Mejia E, Noe A, Orr M, Parham R, Plattner J, Randolph R, Rattendi D, Rewerts C, Sligar J, Yarlett N, Don R, Jacobs R.(2010) Discovery of novel orally bioavailable oxaborole 6-carboxamides that demonstrate cure in a murine model of late-stage central nervous system african trypanosomiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 54 :4379-88.

Nilsen TW. (1995) trans-splicing: an update. *Mol Biochem Parasitol.*73 :1-6. Review.

Njiru ZK, Mikosza AS, Armstrong T, Enyaru JC, Ndung'u JM, Thompson AR.(2008) Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *PLoS Negl Trop Dis.* 6;2 :e147.

North RJ., Mackaness GB.(1963) Electron microscopical observations on the peritoneal macrophages of normal mice and mice immunised with listeria monocytogenes. I. structure of normal macrophages and the early cytoplasmic response to the presence of ingested bacteria. *Br J Exp Pathol*, 44, 601-607.

Oestreich KJ, Weinmann AS.(2012) Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 24:191-5.

Okomo-Assoumou MC, Daulouede S, Lemesre JL, N'Zila-Mouanda A, Vincendeau P.(1995) Correlation of high serum levels of tumor necrosis factor-alpha with disease severity in human African trypanosomiasis. *Am J Trop Med Hyg.* 53 :539-43.

OMS: *La trypanosomiase africaine : lutte et surveillance*, OMS, (1998) Rapport d'un Comité d'experts de l'OMS. Série de Rapports techniques de l'OMS, Genève, Organisation mondiale de la Santé.

Olsson T, Bakhiet M, Edlund C, Höjeberg B, Van der Meide PH, Kristensson K.(1991) .Bidirectional activating signals between *Trypanosoma brucei* and CD8⁺ T cells: a trypanosome-released factor triggers interferon-gamma production that stimulates parasite growth. *Eur J Immunol.*10:2447-54.

Olsson T, Bakhiet M, Höjeberg B, Ljungdahl A, Edlund C, Andersson G, Ekre HP, Fung-Leung WP, Mak T, Wigzell H, Fiszer U, Kristensson K,(1993) CD8 is critically involved in lymphocyte activation by a *T. brucei* brucei-released molecule. *Cell.* 72 :715-27.

Opperdoes FR, Rijke DD, Borst P(1976). Reactions involved in energy transfer in trypanosomes-I. Characterization of the mitochondrial adenine nucleotide translocator and the ATPase of *Crithidia luciliae*. *Comp Biochem Physiol B*. 54 :7-12.

Overath P, Chaudhri M, Steverding D, Ziegelbauer K.(1994) Invariant surface proteins in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Today*. 10 :53-8.

Raper J, Portela MP, Lugli E, Frevert U, Tomlinson S.(2001) Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity. *Curr Opin Microbiol*. 4 :402-8.

Overath P, Engstler M.(2004) Endocytosis, membrane recycling and sorting of GPI-anchored proteins: *Trypanosoma brucei* as a model system. *Mol Microbiol*. 53 :735-44. Review.

Pauleau AL, Rutschman R, Lang R, Pernis A, Watowich SS, Murray PJ.(2004) Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol*. 172 :7565-73.

Paulnock DM, Collier SP, 2001. Analysis of macrophage activation in African trypanosomiasis. *J Leukoc Biol*. 69, 685-690.

Pays E, Vanhollebeke B, Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Nolan DP, Pérez-Morga D.(2006), The trypanolytic factor of human serum. *Nat Rev Microbiol*. 6:477-86.

Pessanha AP, Martins RA, Mattos-Guaraldi AL, Vianna A, Moreira LO.(2012) Arginase-1 expression in granulomas of tuberculosis patients. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 66:265-8.

Pentreath VW, Owolabi AO, Doua F.(1992) Survival of *Trypanosoma brucei brucei* in cerebrospinal fluid. *Ann Trop Med Parasitol*. 86 :29-34.

Pourcet B, Pineda-Torra I.(2013) Transcriptional regulation of macrophage arginase 1 expression and its role in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 23:143-52.

Porembaska Z, Chrzanowska A, Scibior D, Czczot H, Ashamiss F, Luboiński G.(2004) [Usefulness of postoperative assay of arginase activity in blood serum of women after breast cancer resection]. *Pol Merkuri Lekarski*.17:583-5.

Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A.(2009) Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem*.393(2):569-82.

Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Ngouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V.(2009) Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet*.374 (9683):56-64.

Qingshan Wang¹, Hong Ni¹, Lan Lan², Xiaoli Wei¹, Rong Xiang¹ and Yue Wang (2010) Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. *Cell Research* 20:701–712.

Qualls JE, Neale G, Smith AM, Koo MS, DeFreitas AA, Zhang H, Kaplan G, Watowich SS, Murray PJ. (2010) Arginine usage in mycobacteria-infected macrophages depends on autocrine-paracrine cytokine signaling. *Sci Signal.* 3 :ra62.

Quan N, Mhlanga JD, Whiteside MB, McCoy AN, Kristensson K, and Herkenham M. (1999) Chronic overexpression of proinflammatory cytokines and histopathology in the brains of rats infected with *Trypanosoma brucei*. *J Comp Neurol* 414:114–130.

Radwanska M, Chamekh M, Vanhamme L, Claes F, Magez S, Magnus E, de Baetselier P, Büscher P, Pays E.(2002) The serum resistance-associated gene as a diagnostic tool for the detection of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Am J Trop Med Hyg.* 67 :684-90.

Radwanska M, Guirnalda P, De Trez C, Ryffel B, Black S, Magez S.(2008) Trypanosomiasis-induced B cell apoptosis results in loss of protective anti-parasite antibody responses and abolishment of vaccine-induced memory responses. *PLoS Pathog.* 4 :e1000078.

Rajaram MV, Brooks MN, Morris JD, Torrelles JB, Azad AK, Schlesinger LS.(2010) Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J Immunol.*185 :929-42.

Raper J, Portela MP, Lugli E, Frevert U, Tomlinson S.(2001) Trypanosome lytic factors: novel mediators of human innate immunity. *Curr Opin Microbiol.* 4 :402-8.

Rhind SG and Shek PN. (1999) Cytokines in the pathogenesis of human African trypanosomiasis: antagonistic roles of TNF- α and IL-10. In: *Progress in Human African Trypanosomiasis, Sleeping Sickness*, edited by Dumas M, Bouteille B, and Buguet A. Paris: Springer, p. 119–135.

Sarataphan N, Vongpakorn M, Nuansrichay B, Autarkool N, Keowkarnkah T, Rodtian P, Stich RW, Jittapalapong S. (2007) Diagnosis of a *Trypanosoma lewisi*-like (Herpetosoma) infection in a sick infant from Thailand. *J Med Microbiol.* 56:1118-21.

Schleifer KW, Mansfield JM. (1993), Suppressor Macrophages in African Trypanosomiasis Inhibit T Cell Proliferative Responses by Nitric Oxide and Prostaglandins. *J Immunol.* 151 :5492-503.

Sacco RE, Hagen M, Donelson JE, Lynch RG.(1994) B lymphocytes of mice display an aberrant activation phenotype and are cell cycle arrested in G0/G1A during acute infection with *Trypanosoma brucei*. *J Immunol.* 153 :1714-23.

Sanson M, Distel E, Fisher EA.(2013) HDL Induces the Expression of the M2 Macrophage Markers Arginase 1 and Fizz-1 in a STAT6-Dependent Process. *PLoS One.* 2013 Aug 21;8 :e74676.

Schmitt V, Rink L, Uciechowski P. (2013) The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Exp Gerontol.* 48:1379-1386.

Semballa S, Okomo-Assoumou MC, Holzmüller P, Büscher P, Magez S, Lemesre JL, Daulouede S, Courtois P, Geffard M, Vincendeau P. (2007) Identification of a tryptophan-like epitope borne by the variable surface glycoprotein (VSG) of African trypanosomes. *Exp Parasitol.* 115 :173-80.

Shalhoub J, Falck-Hansen MA, Davies AH, Monaco C (2011), Innate immunity and monocyte macrophage activation in atherosclerosis, *Journal of Inflammation.* 8:9.

Shapiro S, Galboiz Y, Lahat N, Kinary A, Miller A.(2003) The 'immunological-synapse' at its APC side in relapsing and secondary-progressive multiple sclerosis: modulation by interferon-beta. *J Neuroimmunol.* 144 :116-24.

Shepherd, V. L., Lee, Y. C., Schlesinger, P. H., and Stahl, P. D. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 1019–1022.

Shiflett AM, Faulkner SD, Cotlin LF, Widener J, Stephens N, Hajduk SL.(2007) African trypanosomes: intracellular trafficking of host defense molecules. *J Eukaryot Microbiol.* 54 :18-21.

Shoda LK, Kegerreis KA, Suarez CE, Roditi I, Corral RS, Bertot GM, Norimine J, Brown WC.(2001) DNA from protozoan parasites *Babesia bovis*, *Trypanosoma cruzi*, and *T. brucei* is mitogenic for B lymphocytes and stimulates macrophage expression of interleukin-12, tumor necrosis factor alpha, and nitric oxide. *Infect Immun.* 69 :2162-71.

Simarro Pere P, Giuliano Cecchi, Massimo Paone, José R Franco, Abdoulaye Diarra, José A Ruiz, Eric M Fèvre, Fabrice Courtin, Raffaele C Mattioli, and Jean G Jannin (2010) The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases *Int J Health Geogr.* 9: 57.

Simarro PP, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Franco JR, Jannin JG.(2011) The human African trypanosomiasis control and surveillance programme of the World Health Organization 2000-2009: the way forward. *PLoS Negl Trop Dis.* 5 :e1007.

Simarro PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Ruiz-Postigo JA, Fèvre EM, Mattioli RC, Jannin JG.(2012) Estimating and mapping the population at risk of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis.* 6 :e1859.

Simpson L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol.* 41:363-82.

Simpson DZ, Hitchen PG, Elmhirst EL, Taylor ME.(1999) Multiple interactions between pituitary hormones and the mannose receptor. *Biochem J.* ;343

Sinha P, Clements VK, Miller S, Ostrand-Rosenberg S.(2005) Tumor immunity: a balancing act between T cell activation, macrophage activation and tumor-induced immune suppression. *Cancer Immunol Immunother.* 54 :1137-42.

Springer AL, Bruhn DF, Kinzel KW, Rosenthal NF, Zukas R, Klingbeil MM.(2011) Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immotility in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 175 :68-75.

Springer AL, Bruhn DF, Kinzel KW, Rosenthal NF, Zukas R, Klingbeil MM. (2011), Silencing of a putative inner arm dynein heavy chain results in flagellar immotility in *Trypanosoma brucei*, Mol Biochem Parasitol. 175 :68-75.

Sullivan L, Wall SJ, Carrington M, and Ferguson A.J. (2013) Proteomic Selection of Immunodiagnostic Antigens for Human African Trypanosomiasis and Generation of a Prototype Lateral Flow Immunodiagnostic Device. PLoS Negl Trop Dis. 7: e2087.

Taheri SA, Shenoy SS, Mousa S.(2001) Circulating soluble tumor necrosis factor receptor as a marker for diagnosis of pulmonary embolus. J Med. 32(3-4):163-8.

Taylor PR, Gordon S, Martinez-Pomares L.(2005) The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition. Trends Immunol. 26(2):104-10.

Taylor JE, Rudenko G.(2006) switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? Trends Genet. 22 :614-20.

Tiribuzi R, Crispoltoni L, Tartacca F, Orlacchio A, Martino S, Palmerini CA, Orlacchio A.(2013) Nitric oxide depletion alters hematopoietic stem cell commitment toward immunogenic dendritic cells. Biochim Biophys Acta. 1830 :2830-8.

Torreale E, Bourdin Trunz B, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazué G, Bray MA, Pécoul B. Fexinidazole--a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. PLoS Negl Trop Dis. 4 :e923.

Torrelles JB, Schlesinger LS.(2010) Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. Tuberculosis (Edinb). 90 :84-93.

Truc P, Gibson W, Herder S (2007) Genetic characterization of *Trypanosoma evansi* isolated from a patient in India. Infect Genet Evol 7: 305–307.

Truc P, Büscher P, Cuny G, Gonzatti MI, Jannin J, Joshi P, Juyal P, Lun ZR, Mattioli R, Pays E, Simarro PP, Teixeira MM, Touratier L, Vincendeau P, Desquesnes M.(2013) Atypical human infections by animal trypanosomes. PLoS Negl Trop Dis.7:e2256.

Tsuruta T, Inoue R, Nagino T, Nishibayashi R, Makioka Y, Ushida K.(2013) Role of the mannose receptor in phagocytosis of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 by antigen-presenting cells. Microbiologyopen. 2 :610-7.

Uzureau P, Uzureau S, Lecordier L, Fontaine F, Tebabi P, Homblé F, Grélard A, Zhendre V, Nolan DP, Lins L, Crowet JM, Pays A, Felu C, Poelvoorde P, Vanhollebeke B, Moestrup SK, Lyngsø J, Pedersen JS, Mottram JC, Dufourc EJ, Pérez-Morga D, Pays E. (2013) Mechanism of *Trypanosoma brucei* gambiense resistance to human serum. Nature.501 :430-4.

Vanhamme L, Paturiaux-Hanocq F, Poelvoorde P, Nolan DP, Lins L, Van Den Abbeele J, Pays A, Tebabi P, Van Xong H, Jacquet A, Moguilevsky N, Dieu M, Kane JP, De Baetselier P, Brasseur R, Pays E.(2003) Apolipoprotein L-I is the trypanosome lytic factor of human serum. Nature. 422 :83-7.

Vanhollebeke B, Truc P, Poelvoorde P, Pays A, Joshi PP, et al., (2006) Human *Trypanosoma evansi* infection linked to a lack of apolipoprotein L-I. N Engl J Med 355 : 2752 – 2756.

Van Nieuwenhove LC, Rogé S, Balharbi F, Dieltjens T, Laurent T, Guisez Y, Büscher P, Lejon V. (2011) Identification of peptide mimotopes of *Trypanosoma brucei* gambiense variant surface glycoproteins. PLoS Negl Trop Dis. 5 :e1189.

Vareille M, Rannou F, Thélier N, Glasser AL, de Sablet T, Martin C, Gobert AP. (2008) Heme oxygenase-1 is a critical regulator of nitric oxide production in enterohemorrhagic *Escherichia coli*-infected human enterocytes. J Immunol. 180:5720-6.

Varin A, Gordon S. (2009) Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. Immunobiology. 214 :630-41.

Vertommen D, Van Roy J, Szikora JP, Rider MH, Michels PA, Oppendoes FR.(2007) Differential expression of glycosomal and mitochondrial proteins in the two major life-cycle stages of *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 2:189-201.

Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. (1994) Nitric Oxide Is Involved in Control of *Trypanosoma cruzi*-Induced Parasitemia and Directly Kills the Parasite *In Vitro*, Infect Immun. 62:5177-82.

Vickerman K.(1985) Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. Br Med Bull. 41:105-14.

Vincendeau P, Daëron M.(1989) *Trypanosoma musculi* co-express several receptors binding rodent IgM, IgE, and IgG subclasses. J Immunol.142:1702-9.

Vincendeau P, Daulouède S.(1991) Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. J Immunol.146:4338-43.

Vincendeau P, Daulouède S, Veyret B, Darde ML, Bouteille B, Lemesre JL.(1992) Nitric oxide-mediated cytostatic activity on *Trypanosoma brucei* gambiense and *Trypanosoma brucei* brucei. Exp Parasitol. 75 :353-60.

Vincendeau P, Gobert AP, Daulouède S, Moynet D, Mossalayi MD.(2003) Arginases in parasitic diseases. Trends Parasitol. (1):9-12.

Vincendeau P, Bouteille B.(2006), Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. An Acad Bras Cienc. 4:645-65.

Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B.(1996) Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. Antimicrob Agents Chemother. 40(1):253-6.

Wilson, H.M, Kluth D.C, Erwig L.P, Ress A.J. (2005), Macrophages et maladies, Flammarion Médecine-Sciences – Actualités Néphrologiques.P 38 – 57.

Williams LM, Ricchetti G, Sarma U, Smallie T, Foxwell BM.(2004), Interleukin-10 suppression of myeloid cell activation--a continuing puzzle, Immunology. 113 :281-92.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr.(2003) Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* 112 :1796-808.

Weinberg JB, Lopansri BK, Mwaikambo E, Granger DL (2008) Arginine, nitric oxide, carbon monoxide, and endothelial function in severe malaria. *Curr Opin Infect Dis.* 5 :468-75..

Woodward R, Gull K.(1990) Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci.*95 :49-57.

Wu G, Morris SM Jr. (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J.* 15; 336 :1-17.

Yu H, Yoo PK, Aguirre CC, Tsoa RW, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD, Iyer RK.(2003) Widespread expression of arginase I in mouse tissues. Biochemical and physiological implications. *J Histochem Cytochem.* 51:1151-60.

Zabaleta J, McGee DJ, Zea AH, Hernández CP, Rodriguez PC, Sierra RA, Correa P, Ochoa AC.(2004) *Helicobacter pylori* arginase inhibits T cell proliferation and reduces the expression of the TCR zeta-chain (CD3zeta). *J Immunol.* 173 :586-93.

Zelante T, De Luca A, D'Angelo C, Moretti S, Romani L.(2009) IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur J Immunol.* 39 :645-8.

Zhou L, Littman DR.(2009) Transcriptional regulatory networks in Th17 cell differentiation. *Curr Opin Immunol.* 21 :146-52.

Résumé - Une nouvelle voie d'immunomodulation, l'induction de l'arginase par les trypanosomes chez leurs hôtes, a été identifiée et caractérisée. Pour éviter la réponse cytotoxique de l'activation « classique » M1 des macrophages et bénéficier de leur activation « alternative » M2, les parasites induisent l'arginase, qui produit la L-ornithine, indispensable à leur développement. Cette voie d'immunomodulation mise en évidence chez la souris infestée par son parasite naturel, *Trypanosoma musculi*, est également présente dans d'autres trypanosomoses, en particulier la trypanosomose humaine africaine (THA). Une augmentation de l'arginase, retrouvée dans le sérum de patients trypanosomés, se normalise après un traitement efficace. *T. brucei gambiense*, parasite de l'homme, induit l'arginase au niveau des macrophages murins et des leucocytes humains. *T. lewisi*, parasite du rat, induit également l'arginase.

Au cours de leur longue coévolution avec leurs hôtes, les trypanosomes extracellulaires ont sélectionné un procédé favorisant leur croissance, l'induction de l'arginase, par des facteurs d'excrétion/sécrétion. Nous avons produit un anticorps monoclonal dirigé contre ce facteur inducteur. Il bloque l'induction de l'arginase par *T. musculi* *in vitro* et *in vivo*. Chez la souris infectée, son injection diminue considérablement la parasitémie. Il a permis l'identification du facteur inducteur, une kinésine orpheline. Cet anticorps, inhibant l'induction de l'arginase par différents trypanosomes, reconnaît une région conservée de la kinésine induisant l'arginase. Cette kinésine se lie à des récepteurs de la membrane des macrophages. *In vitro*, l'addition de mannose à des co-cultures macrophages-parasites bloque l'induction de l'arginase et la multiplication des parasites. Chez la souris infestée par *T. musculi*, l'injection de mannose diminue la parasitémie, qui est également réduite chez les souris Mrc1^{-/-}, KO pour le récepteur mannose. L'utilisation de molécules ciblant la voie inductrice de l'arginase et/ou ce récepteur peut représenter une nouvelle approche thérapeutique dans les trypanosomoses.

Mots clés - Trypanosomes, Trypanosomoses, Macrophage, macrophage activation, arginase, kinésine, récepteur mannose

Summary - Arginase induction, a mechanism of immunomodulation elaborated by trypanosomes has been identified. To avoid cytotoxic classical M1 macrophage activation, trypanosomes induce alternative M2 macrophage activation, which leads to L-ornithine production, essential for parasite growth. This immunomodulation pathway has been evidenced in a natural murine trypanosomiasis provoked by *Trypanosoma musculi*. This mechanism is also evidenced in human African trypanosomiasis (HAT). An increase in serum arginase is measured in HAT patients. A return to normal values is obtained after an efficacious treatment. *Trypanosoma brucei gambiense*, the causative agent of HAT, induces arginase in mouse macrophages and human leucocytes. *T. lewisi*, a rat parasite, also induces macrophage arginase.

During host-parasite co-evolution, extracellular trypanosomes have selected a growth promoting mechanism, macrophage arginase induction by excreted secreted factor (ESF). We have produced a monoclonal antibody which inhibits trypanosome-induced arginase. This antibody blocks *in vitro* and *in vivo* *T. musculi*-induced arginase. Its injection into infected mice provokes a decrease in parasite load. This monoclonal antibody has allowed the identification of an orphan kinesin as the arginase inducing factor. The arginase inducing region of kinesin seems conserved among extracellular trypanosomes. Kinesin binds to macrophage membrane receptors. *In vitro*, addition of mannose to macrophage-parasite cocultures blocks arginase induction and parasite multiplication. Mannose injection decreases parasite load in infected mice. Compared to WT mice, parasite load is highly reduced in infected Mrc1^{-/-} KO mice. In trypanosomiasis, molecules targeting arginase pathway and/or mannose receptor, highly conserved in evolution, might represent new therapeutic approaches.

Keywords Trypanosomes Trypanosomoses, Macrophage, macrophage activation, arginase, kinesin, mannose receptor.