



**HAL**  
open science

# La Trypanosoma cruzi proline racemase, un marqueur diagnostique et de suivi pour la Maladie de Chagas ?

Nicolas Coatnoan

► **To cite this version:**

Nicolas Coatnoan. La Trypanosoma cruzi proline racemase, un marqueur diagnostique et de suivi pour la Maladie de Chagas?. Microbiologie et Parasitologie. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS315 . tel-02864792

**HAL Id: tel-02864792**

**<https://theses.hal.science/tel-02864792>**

Submitted on 11 Jun 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

## Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

*Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosomatidés*

### **La *Trypanosoma cruzi* proline racemase, un marqueur diagnostique et de suivi pour la Maladie de Chagas ?**

Par Nicolas Coatnoan

Thèse de doctorat d'Immunologie / Microbiologie

Dirigée par le Dr Paola Minoprio

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2018

Devant un jury composé de :

Boireau Pascal, Professeur et Rapporteur

Bretagne Stéphane, Professeur et Rapporteur

Chamond Nathalie, Chargée de Recherche et Examineur

Florent Isabelle, Professeur et Examineur

Mariotti-Fernandez Encarnita, Maître de conférences et Examineur

Minoprio Paola, Directrice de Recherche et Directrice de Thèse

Vaquero Catherine, Professeur et Membre invité

## Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du Vivant (ED 515)

*Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosomatidés*

### **La *Trypanosoma cruzi* proline racemase, un marqueur diagnostique et de suivi pour la Maladie de Chagas ?**

Par Nicolas Coatnoan

Thèse de doctorat d'Immunologie / Microbiologie

Dirigée par le Dr Paola Minoprio

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2018

Devant un jury composé de :

Boireau Pascal, Professeur et Rapporteur

Bretagne Stéphane, Professeur et Rapporteur

Chamond Nathalie, Chargée de Recherche et Examineur

Florent Isabelle, Professeur et Examineur

Mariotti-Fernandez Encarnita, Maître de conférences et Examineur

Minoprio Paola, Directrice de Recherche et Directrice de Thèse

Vaquero Catherine, Professeur et Membre invité

*A mes parents  
A Eric*

## REMERCIEMENTS

A Paola, pour m'avoir permis de réaliser ce projet fou à 40 ans et surtout pour sa générosité, ses précieux conseils et d'avoir toujours eu confiance en moi.

A Alain, pour ton soutien sans faille, ta gentillesse et ta détermination.

A Guilherme, pour ces 2 années passées ensemble riche en émotions, et pour ton aide précieuse.

A Thierry, pour ta disponibilité et tes conseils, un grand merci !

A Pierre, encore merci pour m'avoir accueilli dans ton labo lors de cette 3<sup>ème</sup> année de Thèse, et pour ton implication dans le projet. Merci également à toute ton équipe pour m'avoir aidé et accueilli chaleureusement.

Aux collaborateurs de chez bioMérieux France et Brésil, Gláucia, Marc, Karine, Emílio, Daniëlle, j'étais ravi d'avoir pu travailler avec vous sur ce projet.

Aux ami(e)s et collègues de São Paulo, Maria, Lea, Ester, Pedro, Paulinha, Eliana, Carla, Paolo, quel bonheur ces moments partagés dans votre beau et chaleureux pays.

Aux collègues du bâtiment François Jacob et de l'Institut Pasteur, Sébastien, Mariette, Bernadette, Françoise, et aux autres, merci pour votre soutien et votre écoute.

Je remercie particulièrement Pascal Boireau et Stéphane Bretagne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Nathalie Chamond, Isabelle Florent, Encarnita Mariotti-Fernandez qui en sont les examinateurs, et Catherine Vaquero, membre invité, pour l'avoir suivi en tant que représentante de mon comité de Thèse.

*À mes parents, mes frères et ma famille, Laetitia, Danièle, Jacques, Laurent, Rachel, Lou, Lucas et Sacha, merci beaucoup pour votre soutien.*

*À Eric, à ton soutien sans faille depuis plusieurs années maintenant.*

*À mes ami(e)s de Paris, de Nice et d'ailleurs, Aurélie, Emeline, Stéphanie, Jérôme, Sarra, Nacime, Anne, Sophie, Christelle, Christine, Claudio, Elia, Emilie, Sébastien, Gaetan, Jessica, Audrey, Nathalie, Philippe, Otmane, Christold, Patrick et ceux que je n'ai pas cités ...*

## SOMMAIRE

<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>3</u>
<u>SOMMAIRE</u>	<u>5</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>6</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>8</u>
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>9</u>
<u>RESUME</u>	<u>11</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>12</u>
<u>I. INTRODUCTION</u>	<u>13</u>
I.1. LA MALADIE DE CHAGAS	14
I.2. LA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> PROLINE RACEMASE ( <i>TcPRAC</i> )	27
I.3. LES TESTS DIAGNOSTIQUES POUR LA MALADIE DE CHAGAS	29
I.4. HYPOTHESES DE TRAVAIL	41
<u>II. MATERIELS &amp; METHODES</u>	<u>43</u>
<u>III. RESULTATS</u>	<u>50</u>
III.1. LA <i>TcPRAC</i> ET LES ANTICORPS ANTI- <i>TcPRAC</i> PEUVENT ETRE DETECTES DANS LA CIRCULATION PERIPHERIQUE DE SOURIS INFECTÉES PAR <i>T. CRUZI</i>	51
III.2. UTILISATION DE LA <i>TcPRAC</i> COMME BIOMARQUEUR POST-TRAITEMENT	54
III.3. DU MODELE EXPERIMENTAL AUX PREMIERS ESSAIS CHEZ L'HOMME	75
III.4. VERS LE DEVELOPPEMENT D'UN PROTOTYPE PERMETTANT LA DETECTION DU PARASITE INTRACELLULAIRE <i>IN VIVO</i>	78
III.5. DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA <i>TcPRAC</i>	87
<u>IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>108</u>
IV.1. VERS UNE AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DES TESTS DIAGNOSTIQUES UTILISANT LA <i>TcPRAC</i> COMME BIOMARQUEUR	109
IV.2. AMELIORATION DU PROTOTYPE POUR LA DETECTION DU PARASITE <i>IN VIVO</i>	112
IV.3. PERSPECTIVES DIAGNOSTIQUES : DES VHH POUR LA MISE AU POINT DE TEST DE DETECTION	113
IV.4. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	116
IV.5. CONCLUSION FINALE	119
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>120</u>
<u>EVOLUTION PROFESSIONNELLE, PUBLICATIONS ET FORMATIONS</u>	<u>138</u>

## TABLE DES MATIERES

<u>REMERCIEMENTS</u>	<u>3</u>
<u>SOMMAIRE</u>	<u>5</u>
<u>TABLE DES MATIERES</u>	<u>6</u>
<u>TABLE DES ILLUSTRATIONS</u>	<u>8</u>
<u>LISTE DES ABREVIATIONS</u>	<u>9</u>
<u>RESUME</u>	<u>11</u>
<u>ABSTRACT</u>	<u>12</u>
<u>I. INTRODUCTION</u>	<u>13</u>
I.1. LA MALADIE DE CHAGAS	14
I.1.1. Généralités et épidémiologie	14
I.1.2. Le cycle parasitaire	16
I.1.3. La biologie du parasite	17
I.1.3.1. Particularités propres aux trypanosomes	17
I.1.3.2. La phylogénie de <i>T. cruzi</i>	18
I.1.4. Clinique et immunopathologie de la Maladie de Chagas	19
I.1.4.1. La phase aiguë	19
I.1.4.2. La phase chronique	19
I.1.4.3. Les traitements	20
I.1.4.4. L'immunobiologie de l'infection et les marqueurs biologiques de l'hôte	20
I.1.4.5. Les mécanismes d'échappement de <i>T. cruzi</i>	23
I.2. LA <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> PROLINE RACEMASE ( <i>TcPRAC</i> )	27
I.3. LES TESTS DIAGNOSTIQUES POUR LA MALADIE DE CHAGAS	29
I.3.1. Les tests diagnostiques directs	29
I.3.2. Les tests sérologiques indirects	30
I.3.3. Les critères d'évaluation d'un test diagnostique	31
I.3.4. Vers le développement de nouveaux marqueurs diagnostiques et de suivi post-traitement	33
I.3.5. Développement de nouveaux outils : anticorps conventionnels « versus » V <sub>H</sub> H	35
I.3.5.1. Les propriétés biologiques et physico-chimiques des V <sub>H</sub> H	37
I.3.5.2. L'obtention de V <sub>H</sub> H recombinants	37
I.3.5.3. Exemples de V <sub>H</sub> H utilisés en tant que traceurs <i>in vivo</i> par imagerie médicale	39
I.4. HYPOTHESES DE TRAVAIL	41
<u>II. MATERIELS &amp; METHODES</u>	<u>43</u>

<b><u>III. RESULTATS</u></b>	<b>50</b>
III.1. LA TcPRAC ET LES ANTICORPS ANTI-TcPRAC PEUVENT ETRE DETECTES DANS LA CIRCULATION PERIPHERIQUE DE SOURIS INFECTÉES PAR <i>T. CRUZI</i>	51
III.2. UTILISATION DE LA TcPRAC COMME BIOMARQUEUR POST-TRAITEMENT	54
ARTICLE 1	57
III.3. DU MODELE EXPERIMENTAL AUX PREMIERS ESSAIS CHEZ L'HOMME	75
III.4. VERS LE DEVELOPPEMENT D'UN PROTOTYPE PERMETTANT LA DETECTION DU PARASITE INTRACELLULAIRE <i>IN VIVO</i>	78
III.4.1. Sélection des V <sub>H</sub> H anti-TcPRAC utilisés pour les études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	78
III.4.2. Détection de la TcPRAC intracellulaire et/ou membranaire <i>in vitro</i>	79
III.4.3. Détection de la TcPRAC intracellulaire et/ou membranaire <i>in vivo</i>	80
III.5. DEVELOPPEMENT ET OPTIMISATION DE NOUVEAUX INHIBITEURS DE LA TcPRAC	84
ARTICLE 2	86
<b><u>IV. DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u></b>	<b>108</b>
IV.1. VERS UNE AMELIORATION DE LA SENSIBILITE DES TESTS DIAGNOSTIQUES UTILISANT LA TcPRAC COMME BIOMARQUEUR	109
IV.2. AMELIORATION DU PROTOTYPE POUR LA DETECTION DU PARASITE <i>IN VIVO</i>	112
IV.3. PERSPECTIVES DIAGNOSTIQUES : DES V <sub>H</sub> H POUR LA MISE AU POINT DE TEST DE DETECTION	113
IV.4. PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	116
IV.5. CONCLUSION FINALE	119
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u></b>	<b>120</b>
<b><u>EVOLUTION PROFESSIONNELLE, PUBLICATIONS ET FORMATIONS</u></b>	<b>138</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Répartition mondiale des cas de Maladie de Chagas	15
Figure 2 : Le cycle biologique de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figure 3 : Tableau de contingence	32
Figure 4 : Tableau des Recommandations de l’OMS pour le diagnostic de la Maladie	33
Figure 5 : Comparaison entre une IgG conventionnelle et un HcAb de Camélidés	36
Figure 6 : Principe de clonage « sans l’utilisation de sites de restriction »	46
Figure 7 : Détection du parasite par immunofluorescence directe	53
Figure 8 : Dosages des cytokines sériques de souris traitées ou non par le benznidazole	56
Figure 9 : Tableau d’informations concernant la cohorte chagastique chronique	75
Figure 10 : Tableau de contingence concernant la cohorte chagastique chronique	76
Figure 11 : Tableau d’informations concernant la cohorte chagastique aiguë	77
Figure 12 : Alignement des séquences en acides aminés des clones V <sub>H</sub> H anti- <i>TcPRAC</i>	78
Figure 13 : Western blot utilisant le V <sub>H</sub> H anti- <i>TcPRAC</i> couplé à l’Alexa 488	72
Figure 14 : Détection de la <i>TcPRAC</i> intracellulaire par microscopie à fluorescence	80
Figure 15 : Détection des V <sub>H</sub> H anti- <i>TcPRAC</i> couplés à l’IRDye 800 CW <i>in vivo</i> (I)	81
Figure 16 : Détection des V <sub>H</sub> H anti- <i>TcPRAC</i> couplés à l’IRDye 800 CW <i>in vivo</i> (II)	83
Figure 17 : Structure cristallographique de la <i>TcPRAC</i> liée ou non au PYC	85
Figure 18 : Vue d’ensemble des publications utilisant des anticorps V <sub>H</sub> H contre les MTN	115
Figure 19 : Différents types de nanoparticules présentant à leur surface des V <sub>H</sub> H	119

## LISTE DES ABREVIATIONS

AcM :	Anticorps monoclonal
ADCC :	Activité cytotoxique dépendante d'anticorps
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
ADNk :	Acide DésoxyriboNucléique du kinétoplaste
ARN :	Acide Ribo Nucléique
ARNm :	Acide Ribo Nucléique messenger
AVC :	Accident vasculaire cérébral
BHI :	Infusion cœur-cerveau (Brain Heart Infusion)
CDC :	Activité cytotoxique dépendante du système du complément
CDR :	Complement Determining Region
C <sub>H</sub> :	Région constante des chaînes lourdes d'immunoglobulines
C <sub>L</sub> :	Région constante des chaînes légères d'immunoglobulines
CRA :	Antigène répétitif cytoplasmique (Cytoplasmic Repetitive Antigen)
CRP :	Protéine régulatrice du complément (Complement Regulatory Protein)
DTU :	Discrete Typing Unit
EGFR :	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain de type 1
ELISA :	Test immunoenzymatique (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
ESA :	Antigènes excréteurs/sécréteurs de <i>T. cruzi</i> (Excretory/secretory Antigens)
Fc :	Fragment cristallisable
Fab :	Fragment se liant à l'antigène (Fragment antigen binding)
FR :	Framework Region
FRA :	Antigène répétitif du flagelle (Flagellar Repetitive Antigen)
GPI :	Glycosyl Phosphatidyl Inositol
GFP :	Green Fluorescent Protein
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Eau oxygénée
HcAb :	Anticorps à chaîne lourde (Heavy chain Antibody)
HER :	Récepteur du facteur de croissance épidermique humain de type 2
HRP :	Luciférase issue de l'hypocampe (HorseRadish Luciferase)
HSP :	Protéine du choc thermique (Heat Shock Protein)
IFI :	Immunofluorescence indirecte
Ig :	Immunoglobuline
IHA :	Inhibition de l'hémagglutination
IL :	Interleukine
INF :	Interféron
iNOS :	Induction de la synthèse de monoxyde de carbone
IPTG :	IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside
IRDye :	Colorant infra-rouge (Infra Red Dye)
KDa :	Kilo Dalton
LIT :	Liver Infusion Tryptose
MASP :	Protéines de surface associées aux Mucines (Mucins-Associated Surface Protein)
MBL :	Protéine se liant au mannose (Mannan Binding Protein)
MLEE :	MultiLocus Enzyme Electrophoresis
NKT :	Natural Killer Lymphocytes
NO :	Monoxyde d'azote (Nitric Oxid)
NP :	Nanoparticule
ONOO :	Peroxynitrite
PA :	Phosphatase alcaline
PAMP :	Pathogen Associated Molecular Patterns
pb :	Paire de bases
PEG :	Polyéthylène glycol

pI :	Point Isoélectrique
PCR :	Amplification en chaîne par la Polymérase (Polymerase Chain Reaction)
PYC :	2-pyrrole acide carboxylique (PYrol Carboxylic acid)
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
SOD :	Dismutase d'ions superoxyde (Super Oxyde Dismutase)
rTcPRAC :	Protéine recombinante de TcPRAC
TcPRAC :	Proline Racémase de <i>T. cruzi</i> ( <i>T. cruzi</i> Proline RACemase)
TEMP :	Tomographie par émission monophotonique
TEP :	Tomographie par émission de positrons
TGF :	Transforming Growth Factor
TLR :	Récepteurs similaire au récepteur Toll (Toll Like Receptor)
TNF :	Facteur nécrosant de tumeur (Tumor Necrosis Factor)
V $\beta$ :	Région variable de la chaîne $\beta$ du récepteur
V <sub>H</sub> :	Région variable des chaînes lourdes d'immunoglobulines
VHC :	Virus de l'Hépatite C humaine
VHH :	Domaine variable unique des anticorps à chaînes lourdes
V <sub>L</sub> :	Région variable des chaînes légères d'immunoglobulines
VSG :	Glycoprotéine de surface variable (Variant Surface Glycoprotein)

## RESUME

La Maladie de Chagas provoquée par le protozoaire eucaryote *Trypanosoma cruzi* sévit principalement en Amérique Latine et Centrale. On assiste aujourd'hui à l'émergence de ce fléau, au delà des zones d'endémie sur d'autres continents due à l'augmentation de la migration des populations. Cette maladie qui peut rester silencieuse pendant plusieurs années est difficilement décelable en dehors de la phase aiguë de l'infection quand le parasite est plutôt sous sa forme intracellulaire. Aujourd'hui, aucun moyen diagnostique direct ou indirect n'est fiable à 100% et ne permet la détection du parasite dans les tissus profonds. Aucun vaccin n'est disponible et les traitements actuels ne sont pas satisfaisants. A ces difficultés se rajoutent la haute variabilité des souches du parasite ainsi que les importantes réactions croisées avec d'autres pathogènes.

Le laboratoire a découvert et caractérisée la première proline racémase eucaryote qui est également un mitogène pour les cellules B, excrétée/sécrétée par les formes infectantes du parasite : la *Trypanosoma cruzi* proline racémase (*TcPRAC*). Cette enzyme est un facteur de virulence pour le parasite et est indispensable à sa survie. Des études phylogénétiques ont démontré que les gènes codant pour la *TcPRAC* sont présents dans tous les génotypes de *T. cruzi* et sont absents chez les autres trypanosomatidés infectieux pour l'Homme ainsi que chez les mammifères. Par conséquent, la *TcPRAC* pourrait être un marqueur spécifique de la Maladie de Chagas.

Grâce à la mise au point de différents tests sérologiques et moléculaires utilisant différents anticorps spécifiques dirigés contre la *TcPRAC*, ainsi que des amorces ciblant les gènes *TcPRAC*, nous avons pu dépasser certaines de ces difficultés. Nous avons mis en évidence, en utilisant le modèle expérimental, que la *TcPRAC* est effectivement un marqueur diagnostique spécifique de l'infection mais surtout un marqueur qui permettrait d'affirmer l'efficacité d'un traitement, administré aussi bien pendant la phase aiguë que pendant la phase chronique de l'infection.

Nous avons été capables de suivre le processus infectieux en temps réel par imagerie *in vivo* du modèle expérimental grâce à la génération de deux souches de parasites exprimant de façon constitutive le gène de la *Firefly luciferase* et un gène codant pour une molécule fluorescente (la *Green Fluorescent Protein* ou l'E2-Crimson). Nous avons produits des anticorps recombinants V<sub>H</sub>H (ou *Nanobodies*) anti-*TcPRAC*, obtenus suite au criblage par *Phage Display* d'une banque immune d'un alpaca immunisé. Ces V<sub>H</sub>H, de part leur petite taille et leur stabilité, peuvent diffuser rapidement dans les tissus. Ces anticorps ont montré leur capacité de pénétrer et de se fixer sur la *TcPRAC* intracellulaire exprimée par des parasites vivants *in vitro*. Avec ces outils, nous avons entrepris la mise au point d'un prototype pour la détection des parasites intracellulaires *in vivo*.

Par ailleurs, à partir de la structure cristallographique de la *TcPRAC* et du développement d'un modèle virtuel générant différents états de transitions potentiels de l'enzyme et du site catalytique en présence ou non de son ligand, nous avons pu cibler et optimiser de nouveaux composés trypanocides en vue d'un développement de nouvelles chimiothérapies contre la Maladie de Chagas.

## ABSTRACT

Chagas disease caused by the eukaryotic protozoan *Trypanosoma cruzi* occurs mainly in Latin and Central America. Today the emergence of this plague is occurring beyond endemic areas on other continents due to the increase in population migration. This disease, which can remain silent for several year is difficult to detect after the acute phase of the infection when the parasite is in its intracellular form. Today, no direct or indirect diagnostic test is 100% reliable and allows detection of the parasite in deep tissues. No vaccine is available and current treatments are not satisfactory. To these difficulties are added the high variability of strains of the parasite as well as the important cross-reactions with other pathogens.

The laboratory has discovered and characterized the first eukaryotic proline racemase that is also a B cell mitogen, which is excreted / secreted by the infective forms of the parasite: the *Trypanosoma cruzi* proline racemase (*TcPRAC*). This enzyme is a virulence factor for the parasite and is essential for its survival. Phylogenetic studies have shown that genes coding for *TcPRAC* are present in all *T. cruzi* genotypes and are absent in other trypanosomatids that are infectious to humans as well as to mammals. Therefore, *TcPRAC* could be one of the specific markers of Chagas Disease.

With the set-up of different serological and molecular tests using different specific antibodies directed against *TcPRAC*, as well as primers targeting the *TcPRAC* genes, we have been able to address some of these difficulties. We have demonstrated, using the experimental model, that the *TcPRAC* is indeed a specific diagnostic marker of the infection but especially a marker which would make it possible to affirm the effectiveness of a treatment, administered both during the acute phase and during the chronic phase of the infection.

We were able to follow the infectious process in real time by *in vivo* imaging of the experimental model through the generation of two parasite strains constitutively expressing the Firefly luciferase gene and a gene encoding a fluorescent molecule (the Green Fluorescent Protein or E2-Crimson). We have produced anti-*TcPRAC* V<sub>H</sub>H (or Nanobodies) recombinant antibodies, obtained by the *Phage Display* screening of an immune library of an immunized alpaca. These nanobodies, because of their small size and stability, spread rapidly in the tissues. These antibodies have shown their ability to penetrate and bind to intracellular *TcPRAC* expressed by live parasites *in vitro*. With these tools, we have begun the development of a prototype for the detection of intracellular parasites *in vivo*.

Moreover, from the crystallographic structure of the *TcPRAC* and the development of a virtual model generating different transition states assumed by the enzyme and its catalytic site in the presence or absence of its ligand, we were able to target and optimize new trypanocidal compounds for the development of new chemotherapies against Chagas Disease.

## **I. INTRODUCTION**

## I.1. LA MALADIE DE CHAGAS

### I.1.1. Généralités et épidémiologie

Le 4<sup>ème</sup> rapport de l'OMS concernant les Maladies Tropicales Négligées (MTN), sorti en 2017, fait état de 10 années d'efforts concertés par le regroupement de plusieurs partenaires mondiaux contre les 19 Maladies Tropicales Négligées (OMS 2017). Comme exemples de l'ampleur des maladies négligées, 1 milliard de personnes ont eu recours à un traitement pour au moins une MTN en 2015. C'est plus d'un milliard de personnes infectées. Les MTN affectent 149 pays et coûtent plusieurs milliards de dollars chaque année aux pays concernés.

La Maladie de Chagas fait partie des MTN. C'est une parasitose provoquée par le protozoaire flagellé *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). En 1909, le médecin brésilien Carlos Chagas a découvert et décrit l'agent étiologique de la maladie, les insectes vecteurs hématophages qui transmettent le parasite à l'Homme et la pathologie (Chagas C. 1909). Les zones d'endémie de la Maladie concernent 21 pays d'Amérique du Sud et Centrale. Le nombre de personnes infectées est estimé entre 6 à 8 millions et 70 millions de personnes sont exposées au risque d'infection. Cette maladie provoque la mort de 12000 personnes par an (DNDi Annual Report 2017).

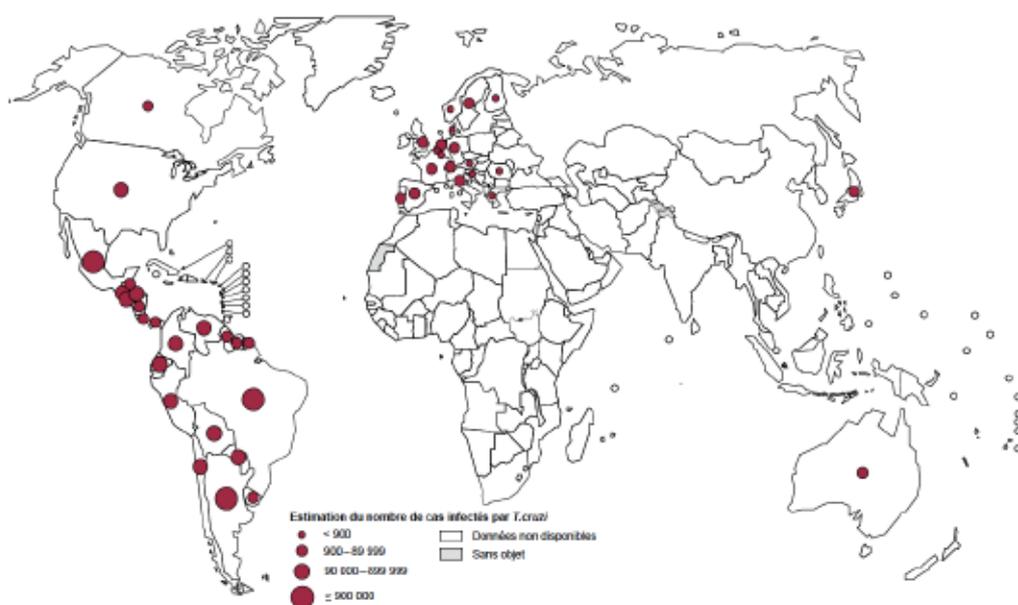
La transmission « originelle » dite vectorielle, c'est à dire par l'intermédiaire d'un insecte hématophage touche surtout les populations pauvres et rurales latino-américaines, où les conditions d'habitations très modestes sont favorables à l'implantation du vecteur. Le schéma épidémiologique de la Maladie comporte 2 cycles : (i) le cycle domestique lorsque l'insecte vecteur vit et se reproduit dans les habitations et par conséquent infecte l'Homme (et les animaux domestiques) et (ii) le cycle selvatique (ou sauvage) lorsque les hôtes mammifères vivent à l'état sauvage. *Trypanosoma cruzi*, par le biais de 70 espèces différentes d'insectes vecteurs, est capable d'infecter 180 espèces de mammifères différentes ce qui constitue une multitude de réservoirs pour le parasite. De ce constat, de grandes campagnes de désinsectisation contre les insectes vecteurs dans les zones d'endémie ont eu lieu et ont permis de diminuer significativement la prévalence de la Maladie. Dans les années 1990, 18 millions de personnes étaient infectées.

Suite au taux de migration élevé de ces populations rurales vers les grands centres urbains dans les années 1970 et 1980, d'autres modes de transmission ont été décrits (i) transfusionnel, c'est à dire par transfusion sanguine d'une personne infectée à une autre personne saine. L'infection peut également avoir lieu par transplantation d'organes ou de tissus; (ii) congénital où une mère infectée par *T. cruzi* peut transmettre le parasite à son enfant ; (iii) oral : cas d'infections recensés à cause de jus de fruits pressés contaminés par des insectes vecteurs infectés ou ses déjections, ou encore par l'intermédiaire de viande contaminée et consommée crue ; (iv) par aérosol : habitations très infestées par des insectes contaminés et mal ventilées et (v) accidentel, en laboratoire.

Suite aux migrations des populations, la Maladie de Chagas est présente dans plusieurs pays non endémiques (voir Figure 1). L'OMS a estimé que plus de 300000 personnes originaires de l'Amérique Latine et Centrale vivant aux Etats-Unis seraient infectées (Bern & Montgomery 2009). En Europe, ce serait 80000 personnes atteintes de la maladie dont seulement 4000 cas ont été diagnostiqués en laboratoire. De plus, quelques cas récents d'infection soupçonnés d'être de type vectorielle ont même été rapportés aux Etats-Unis (Cantey et al 2012).

Enfin, certaines études ont estimé que les coûts liés aux soins de santé et au nombre de jours d'arrêt maladie représenteraient 40 millions d'euros par an pour 100000 personnes malades. Le coût économique global de la Maladie de Chagas dépasserait les 7 milliards de dollars/an.

Ainsi, plus d'un siècle après la découverte de la Maladie, « La maladie de Chagas endémique a commencé comme une maladie négligée des populations pauvres, rurales et oubliées. Sa propagation de l'Amérique latine vers les pays non endémiques est un encore un défi mondial. » (Coura & Vinas 2010 ; Tanowitz et al 2011).



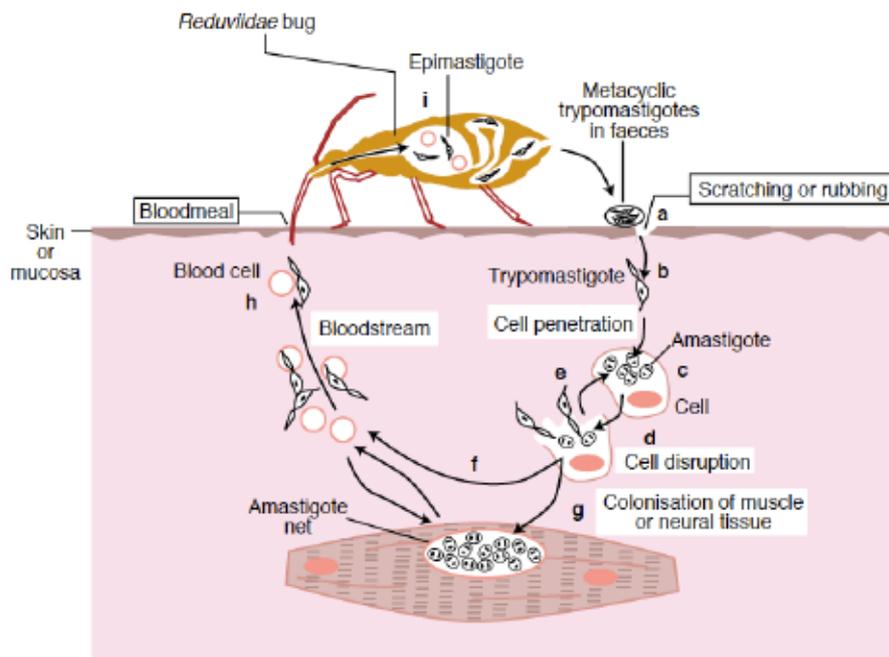
**Figure 1 : Répartition mondiale des cas de maladie de Chagas (estimations officielles 2006-2015)**  
D'après le 4<sup>ème</sup> Rapport de l'OMS sur les Maladies Tropicales Négligées, 2017.

### I.1.2. Le cycle parasitaire

La Maladie de Chagas (ou Trypanosomiase américaine) est provoquée par l'espèce *Trypanosoma cruzi*, protozoaire eucaryote uniflagellé appartenant à l'ordre des Kinétoplastidés et à la famille des *Trypanosomatidae* (regroupe les genres *Trypanosoma* et *Leishmania*).

Le cycle biologique de *T. cruzi* est digénétique car nécessite obligatoirement un insecte vecteur invertébré et un hôte mammifère vertébré. Les insectes capables de transmettre le parasite appartiennent à la famille des *Reduviidae*, sous-famille des *Triatominae*. Les principales espèces domiciliées dans les habitations sont *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* et *Panstrongylus megistus*. Couramment nommés triatomes ou réduves, ces punaises sont hématophages dans les deux sexes.

Durant son cycle, le parasite présente au moins quatre stades morphologiques (voir Figure 2). Un insecte vecteur se contamine sur un hôte mammifère infecté lors d'un repas sanguin contenant les formes trypomastigotes sanguines du parasite. Ces formes vont se différencier dans la partie antérieure du tube digestif de l'insecte en formes épimastigotes non infectantes capables de se multiplier par fission binaire. Au niveau postérieur du tube digestif, des signaux extracellulaires vont permettre la différenciation des formes épimastigotes répliquatives en forme trypomastigotes métacycliques non répliquatives mais infectantes pour l'hôte mammifère. C'est ainsi, que la transmission naturelle à un hôte mammifère, via un insecte vecteur infecté, se produit lorsque les excréments chargés de parasites infectants trypomastigotes métacycliques viennent contaminer soit les muqueuses buccales ou nasales, la conjonctive ou des plaies au niveau de la peau (y compris la zone de piqûre de l'insecte). Au niveau du site d'infection, les trypomastigotes métacycliques pénètrent dans les cellules de l'hôte et se différencient en formes intracellulaires répliquatives : les formes amastigotes. Ces dernières se multiplient dans le cytoplasme de la cellule infectée, se redifférencient en forme trypomastigotes et peuvent être relarguées dans la circulation sanguine suite à la rupture des cellules infectées. Ces parasites sont capables d'envahir de nouvelles cellules saines avoisinantes ou à des sites distants via la circulation sanguine et/ou lymphatique. Bien que toutes les cellules nucléées peuvent être parasitées par *T. cruzi*, en fonction des souches (lignées) de parasites, celles préférentiellement infectées sont les macrophages, les cellules musculaires lisses et squelettiques, les cellules du système réticulo-endothélial et les cellules du tissu adipeux. Et, les trypomastigotes présents dans le sang peuvent alors être prélevés par un insecte vecteur lors d'un repas sanguin.



**Figure 2 : Le cycle biologique de *Trypanosoma cruzi***

Les formes trypomastigotes métacycliques infectantes, présentes dans les fèces d'un vecteur hématophage contaminé, pénètrent chez l'hôte mammifère au niveau d'une zone de blessure (a). Le trypomastigote mobile peut infecter une cellule nucléée de l'hôte (b). Dans cette cellule, le parasite se différencie sous la forme amastigote répliquative (c). Avant la rupture membranaire de la cellule infectée, les formes amastigotes, après plusieurs cycles de répllication, se différencient à nouveau sous la forme trypomastigote capable d'infecter de nouvelles cellules (d et e). Via la circulation sanguine, les formes trypomastigotes infectent préférentiellement les cellules musculaires (g) ou peuvent être absorbées par un insecte vecteur lors d'un repas sanguin (h). Dans la partie antérieure du tube digestif de l'insecte, le trypomastigote se différencie en épimastigote où ils se multiplient (i) puis se différencient en trypomastigotes métacycliques dans la partie postérieure. D'après Expert Reviews in Molecular Medicine, Cambridge University Press 2002.

### I.1.3. La biologie du parasite

#### I.1.3.1. Particularités propres aux trypanosomes

Tous les trypanosomatidés possèdent un kinétoplaste. C'est un réseau entrelacé d'ADN circulaires, nommé ADN du kinétoplaste (*kDNA*) présent dans l'unique mitochondrie du parasite. Le *kDNA* est composé de maxicercles (20 à 40kb) et de minicercles (0,5 à 2 kb) codant principalement pour la chaîne respiratoire du parasite (De Souza et al 2009). Il est associé à la base du flagelle. En fonction de la position du kinétoplaste par rapport à la position du noyau et du flagelle, la classification en différents stades des trypanosomatidés a été établie (Hoare & Wallace 1966).

A la base du flagelle se trouve la poche flagellaire, petite invagination de la membrane plasmique associée au réticulum endoplasmique et à l'appareil de Golgi. C'est l'unique endroit où le parasite peut échanger avec le milieu extérieur par des processus d'endocytose et d'exocytose. La poche flagellaire joue, entre autre, un rôle important dans le trafic cellulaire (Field & Carrington 2009).

Chez *T. cruzi*, le nombre et la taille des chromosomes entre les souches sont variables (Henriksson et al 1996 ; Vargas et al 2004). Lors de la division cellulaire, ils sont peu condensés à la différence des eucaryotes supérieurs. Le nombre important de chromosomes équivalents de petites tailles rend difficile leur quantification exacte. Par ailleurs, il a été montré que des chromosomes de tailles différentes pouvaient être homologues. Une des hypothèses expliquant cette variation de taille entre chromosomes homologues serait l'augmentation progressive du nombre de séquences répétées pouvant représenter jusqu'à 50% de l'ADN total chez *T. cruzi* (Henriksson et al 2002 ; El-Sayed et al 2005).

#### I.1.3.2. La phylogénie de *T. cruzi*

La classification de l'espèce *T. cruzi* est complexe de part la grande diversité génétique et phénotypique retrouvée entre les différentes souches évoluant soit dans le cycle selvatique soit dans le cycle domestique. Les premières classifications, basées principalement sur l'étude des caractères morphologiques, ont évolué avec les progrès de la biologie moléculaire.

Des premières études ont comparé les profils de différentes souches isolées de *T. cruzi* obtenus par la technique de *Multilocus Enzyme Electrophoresis* (MLEE). Les souches ont été classées en 3 sous-groupes appelés zymodèmes (Miles et al 1978). Plus tard, l'analyse des gènes codant l'ARN ribosomal et des gènes du mini-exon par *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) a suggéré l'existence de 2 lignées phylogénétiques majeures nommées *T. cruzi I* et *T. cruzi II* (Steindel et al 1993 ; Souto et al 1996 ; Nunes et al 1997). L'analyse combinée de différents marqueurs par MLEE et RAPD a permis de distinguer cinq sous-divisions au sein de la lignée majeure *T. cruzi II* (Brisse et al 2000). Dans les années 2000, d'autres études de génotypage ont permis de classer *T. cruzi* en six génotypes (ou DTU pour *Discrete Typing Units*) référencées de *TcI* à *TcVI* (Zingales et al 2009). Bien que l'évolution issue d'un ancêtre ancestral de *T. cruzi* semble être principalement clonale, d'autres données ont suggéré la possibilité d'échange génétique entre les souches (Tibayrenc et al 1986 ; Messenger & Miles 2015). Les processus d'évolution au sein de chaque génotype ne sont pas encore entièrement connus. Les souches classées *TcV* et *TcVI* seraient des souches hybrides issues de souches appartenant aux génotypes *TcII* et *TcIII* (Westenberger et al 2005). La souche de référence CL Brener (*TcVI*), utilisée pour le projet génome, serait une souche hybride. De plus, l'inventaire de plus de 6000 souches de *T. cruzi* a montré une prédominance pour le génotype *TcI* (60 % des souches), une répartition géographique sur toute la zone d'endémie et une forte variabilité génétique compatible avec une évolution à long terme (Brenière et al 2016). Les souches classées dans les génotypes *TcI*, *TcII*, *TcV* et *TcVI* sont responsables de la majorité des cas de la Maladie de Chagas avec une prévalence du génotype *TcI* en Amérique Centrale et du génotype *TcII* en Amérique du Sud.

#### I.1.4. Clinique et Immunopathologie de la Maladie de Chagas

La maladie de Chagas est caractérisée par deux phases : une phase aiguë suivi d'une phase chronique.

##### I.1.4.1. La phase aiguë

Cette phase débute lorsqu'un insecte contaminé par *T. cruzi* infecte un individu. Après une période d'incubation allant de 1 à 3 semaines, souvent peu symptomatique, une personne nouvellement infectée peut manifester divers symptômes tels que de la fièvre, des nausées, des vomissements, des diarrhées, une éruption cutanée. On peut observer une lésion inflammatoire indurée et gonflée au niveau du site d'entrée du parasite appelé « chagome », un œdème périorbitaire unilatéral, appelé signe de Romana (lors de l'infection de la conjonctive oculaire). Des signes d'adénopathies et d'hépatosplénomégalie modérée peuvent également être observés lors de la phase aiguë de l'infection. Pourtant, dans la majorité des cas, la phase aiguë passe inaperçue car elle peut être cliniquement muette ou alors parce que les symptômes (fièvre, fatigue...) ne sont pas spécifiques d'une infection par *T. cruzi*.

Pour la plupart des malades, une réponse immunitaire se développe. Faisant suite à une parasitémie élevée, les symptômes associés se résolvent environ 2 à 4 mois après l'infection. La mortalité (taux inférieur à 2%) durant la phase aiguë concerne surtout les enfants âgés de moins de 2 ans, souvent due à une cardiopathie aiguë, ou dans quelques cas à une méningo-encéphalite. C'est alors que la majorité des malades vont entrer dans la phase chronique (majoritairement asymptomatique) qui peut durer des décennies sans manifestations cliniques de l'infection. Ces malades présentent une sérologie positive mais une absence de parasites circulants.

Des études ont démontré l'importance du tissu adipeux en faveur du parasite lors de la phase aiguë et chronique de l'infection. La démonstration de l'infection des adipocytes chez le modèle murin, l'augmentation significative du nombre de macrophages et l'augmentation de l'expression de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires dans le tissu adipeux sous-cutané au début de la phase aiguë, et la mise en évidence du parasite chez des patients chagasiens chroniques dans le tissu adipeux indiquent fortement que ce dernier est une cible précoce lors de l'infection et pourrait avoir une fonction de réservoir (Combs et al 2005 ; Nagajyothi F et al. 2012 ; Ferreira et al. 2011).

##### I.1.4.2. La phase chronique

Elle peut durer de quelques mois à plusieurs dizaines d'années en l'absence de symptomatologie clinique pour 2/3 des personnes infectées. Par contre, 30 à 40 % des personnes infectées vont développer des complications tardives de la maladie qui peuvent être (i) une atteinte cardiaque dans 20 à 30 % des cas : c'est la cardiopathie chronique chagastique dit aussi « signe de la batterie », très arythmogène (extrasystoles ventriculaires et tachycardie ventriculaire), avec un cœur qui augmente considérablement de taille. Il y a le développement

d'une insuffisance cardiaque progressive et donc des risques de mort subite (embolies, rupture d'anévrisme ventriculaire gauche) ; (ii) des atteintes digestives dans 6 à 15 % des cas : méga-œsophage et méga-colon (sigmoïde et rectum) ; (iii) des atteintes mixtes (cardiaque et digestive) ; (iv) des atteintes neurologiques dans 3 % des cas : accident vasculaire cérébral (AVC) chez les personnes cardiaques, méningo-encéphalite et chagomes intracérébraux.

Les traitements pour la cardiopathie chagasique sont les mêmes que pour les autres types de cardiopathies : pause d'un *pace-maker* jusqu'à la transplantation cardiaque pour les cas les plus avancés. Concernant les formes digestives, la résection des anses dilatées est pratiquée.

#### I.1.4.3. Les traitements

Il n'existe pas de vaccin contre la maladie de Chagas et seulement deux molécules trypanocides sont actuellement utilisées : le Benznidazole et le Nifurtimox. Le traitement pris au début de la phase aiguë est efficace à près de 100% et permet la guérison de la Maladie. Il est recommandé de traiter : les nouveau-nés infectés (infection congénitale) idéalement pendant les 6 premiers mois de vie ; les cas de réactivation de l'infection provoqué par un état d'immunodépression ; et les patients en début de phase chronique. En 2017, la *US Food & Drug Administration* (FDA) vient d'approuver le traitement des enfants avec des doses adaptées du benznidazole (DNDi Annual Report 2017). Par contre, il est fortement déconseillé de traiter les mères infectées pendant leur grossesse car des effets tératogènes des traitements sont suspectés (Carlier et al 2015). L'efficacité réelle des traitements disponibles pour les patients infectés depuis de nombreuses années n'est pas connue (Viotti et al 2006). Pourtant, les traitements auraient comme bénéfices potentiels d'enrayer la progression de la Maladie et, d'éviter la transmission de l'infection. Le calcul bénéfice/risque pour ces patients est, bien évidemment, à prendre en compte car le traitement peut provoquer des effets indésirables conséquents, parfois dans 40 à 50% des cas.

Pourtant, aujourd'hui moins de 1% des personnes infectées par *T. cruzi* ont accès à un traitement et à un diagnostique. Comme le souligne les principaux objectifs du DNDi concernant la Maladie de Chagas, il y a un fort besoin de développer de nouveaux traitements sûrs et efficaces pendant la phase chronique de l'infection ainsi que de découvrir des marqueurs permettant de déterminer de façon précoce la réponse au traitement (DNDi 2017).

#### I.1.4.4. L'immunobiologie de l'infection et les marqueurs biologiques de l'hôte

L'infection par *T. cruzi* va entraîner chez l'hôte le développement d'une réponse immunitaire impliquant aussi bien les cellules de l'immunité innée que les cellules de l'immunité adaptative. Bien que le parasite est capable d'infecter de nombreux types de cellules nucléées, avec un tropisme préférentiel en fonction des génotypes et des souches de *T. cruzi*, les macrophages et les cardiomyocytes vont être une cible privilégiée au cours de l'infection.

Au tout début de la phase aiguë, l'infection est caractérisée par une intense réaction inflammatoire au niveau du site de pénétration du parasite. La reconnaissance du parasite par

les cellules de l'immunité innée exprimant à leur surface les TLR2, TLR4 et TLR9 va avoir lieu par la reconnaissance de motifs répétés et conservés (i.e. PAMP pour *Pathogen Associated Molecular Patterns*) correspondant principalement aux glycoprotéines et/ou glycophospholipides telles que des mucines ancrées par des structures GPI (i.e. *Glycosylphosphatidylinositol*) et des glycoinositolphospholipides (GPILs) présents en très grand nombre au niveau de la matrice extracellulaire du parasite (Oliveira et al 2004 ; Bafica et al 2006 ; Soares et al 2012). Ces motifs vont entraîner, via l'activation de la voie NFκB, une réponse inflammatoire par l'expression de cytokines pro-inflammatoires et de molécules co-stimulatrices des cellules du système adaptatif (Kayama et al 2010). Les macrophages activés vont produire les cytokines IL-12 et TNFα (Camargo et al 1997). La production d'IL-12 va stimuler les cellules NKT qui à leur tour vont sécréter une autre cytokine inflammatoire, l'IFNγ, qui va stimuler de nouveaux macrophages et entraîner la différenciation et la prolifération de cellules T CD4+ de type Th1. Les cellules T CD4+ vont alors orchestrer une réponse cellulaire T CD8+, qui activées produisent de l'IFNβ, cytokine essentielle pour l'induction, le maintien et le contrôle de l'infection aiguë (Cardillo et al 1996 ; Aliberti et al 1996). Par ailleurs, l'IFNγ et dans un deuxième temps le TNFα, vont stimuler la voie de l'oxyde nitrique synthase (i.e. iNOS pour *inducible Nitric Oxid Synthase*) et ainsi permettent la production de monoxyde d'azote (NO) par les macrophages infectés afin de tuer les parasites intracellulaires (Camargo et al 1997).

Bien qu'une réponse immunitaire est mise en place dès le début de l'infection, *T. cruzi* arrive à survivre et à échapper de façon précoce aux défenses de l'hôte par différents mécanismes et à se multiplier dans différentes cellules de l'organisme (voir Chapitre 2).

Les myocytes cardiaques réagissent à différentes situations de stress, via les récepteurs TLRs 2, 3, 4 et 6, entre autres par un mécanisme d'hypertrophie à court terme. Les cellules cardiaques infectées par *T. cruzi* réagissent via le TLR2 en sécrétant une cytokine inflammatoire l'IL-1β (Petersen et Burleigh 2003). Si l'état de stress (hypertrophie) se prolonge, les cellules cardiaque évoluent vers des phénomènes d'apoptose et de fibrose, à un état de cardiopathie dilatée jusqu'au stade ultime d'arrêt cardiaque par congestion (De Kleijn et Pasterkamp 2003 ; Frey et Olson 2003).

Bien qu'une réponse de type Th1 est nécessaire pour contrôler l'infection aiguë, pendant la phase chronique il a été observé chez l'Homme qu'une réponse inflammatoire de type Th1 exacerbée/disproportionnée par rapport à la charge parasitaire, principalement orchestrée par les cellules T CD4+ et les monocytes/macrophages, serait responsable des lésions cardiaques, caractérisées par des infiltrats inflammatoires composés de macrophages, de cellules T CD4+ et particulièrement de cellules T CD8+ durant la phase chronique (Higuchi et al 1997). Un déséquilibre en faveur des cytokines de type Th1 entrainerait une fibrose et une destruction du tissu cardiaque (Souza PE et al 2007 ; Gomes et al 2003). Des taux élevés d'IL-1β, d'IL-6, d'IFNγ et de TNFα sont retrouvés chez les patients chagasiques présentant une cardiomyopathie (Sousa et al 2014).

D'autres études ont mis en évidence que la balance entre les taux d'IFNγ et d'IL-10 (cytokine anti-inflammatoire majeure modulant une réponse de type Th2) était corrélée à la progression

de la cardiopathie dans le cas où des taux élevés d'IFN $\gamma$  persistaient, associés à une diminution de production d'IL-10 (D'Avila et al 2009 ; De Sousa et al 2014). L'IL-17, autre cytokine anti-inflammatoire composante centrale d'une réponse de type Th17, jouerait un rôle protecteur. Chez l'Homme, des taux élevés d'expression de cette cytokine sont associés à une meilleure fonction cardiaque (Magalhães et al 2013). La production d'IL-17 modulerait la réponse Th1 et permettrait (i) de contrôler la myocardite induite par la présence du parasite dans les cardiomyocytes et (ii) le flux de cellules inflammatoires dans le tissu cardiaque (Da Matta Guedes et al 2010). L'IL-10 et L'IL-17 pourraient être considérés comme des marqueurs pronostiques de la progression de la Maladie.

Par contre, le TGF $\beta$  une cytokine anti-inflammatoire faciliterait la pénétration et la persistance du parasite dans les cellules et induirait des phénomènes de fibrose et de remodelage du tissu cardiaque (Silva et al 1991 ; Waghbi et al 2005 ; Rossi et al 1991 ; Araujo-Jorge 2002). Cette cytokine est décrite comme un potentiel biomarqueur pronostique de la cardiopathie chagasique car des taux sériques élevés de TGF $\beta$  ainsi que sa forme active présente dans le myocarde ont été observés chez des patients chagasiques chroniques (Saraiva et al 2013).

De plus, il a été montré que certaines cytokines seraient en lien avec la production de certaines chémokines comme CXCL9, CXCL10 et CCL5. Ces dernières seraient produites tout au long de l'infection et leur présence a été corrélée avec des infiltrats de cellules T CD4+ CD8+ (Talvani et al 2000). Dans le modèle expérimental, un nombre important de cellules T CD8+ exprimant le récepteur CCR5 a été retrouvé dans des infiltrats inflammatoires de cœur de souris infectées par *T. cruzi* (Machado et al 2005). Un traitement avec des molécules antagonistes des récepteurs CCR1 et CCR5 a montré une survie accrue et une diminution de l'inflammation cardiaque sans qu'une augmentation de la parasitémie et du nombre de parasites n'ait été retrouvé dans le cœur de souris infectées et traitées (Marino et al 2004). A l'inverse, CXCL9 et CXCL10 auraient un rôle dans la génération d'une réponse immune protectrice sans entraîner d'inflammation au niveau du tissu cardiaque (Hardison et al 2006).

Par ailleurs, la cardiopathie chagasique pourrait aussi être expliquée par l'hyperréactivité des cellules T CD8+ dirigés contre des protéines cardiaques de l'hôte due à des réactions croisées avec des antigènes majeurs de *T. cruzi* (Cunha-Neto et al 1995 ; Martin et Tarleton 2004). Un nombre important de cellules T CD8+ est retrouvé dans les lésions cardiaques (Higuchi et al 1997). La fréquence de cellules T spécifiques de *T. cruzi* et productrices d'IFN $\gamma$  diminue dans les sérums de patients chagasiques traités par le benznidazole (Lauella 2009).

L'hypothèse d'un dysfonctionnement des mécanismes immuns régulateurs dans la progression de la Maladie a été démontrée (Cardillo et al 2015). Dans le modèle expérimental, il a été montré que des cellules T régulatrices exprimant le phénotype CD4+ CD25+ Foxp3+ aidaient à contrôler la réponse inflammatoire chez des souris chroniquement infectées par *T. cruzi* (Nihei et al 2014). Chez l'Homme, les patients chagasiques asymptomatiques présentent des taux plus importants de cellules T régulatrices exprimant un phénotype majoritaire de

type CD4+ CD25+ que ceux ayant développés une cardiopathie chagastique (Belkaid Y 2007 ; De Araujo et al 2011).

Concernant la réponse humorale mise en place suite à l'infection par *T. cruzi*, la même dualité a été observée comme pour la réponse cellulaire. Des anticorps anti-galactose nommés « anticorps lytiques » sont capables de reconnaître des épitopes glycosylés présents sur la membrane du parasite et de diriger la lyse contre les formes trypomastigotes de *T. cruzi* (Gazzinelli et al 1991). La détection de ces anticorps par leurs isotypes IgM et IgG permettrait de différencier les stades de la Maladie (Antas et al 1999). De plus, ces anticorps sembleraient avoir un rôle protecteur car des taux élevés sont retrouvés chez les patients chagastiques asymptomatiques (comparativement aux patients ayant développé une cardiopathie) et pourraient être un marqueur diagnostique et pronostique de l'efficacité des traitements (Cordeiro et al 2001). Par contre, d'autres études ont révélé que des malades « chroniques » développaient des anticorps réagissant contre des molécules du « soi », tels que des anticorps anti-récepteurs adrénergique  $\beta$  ou encore anti-myosine, et seraient ainsi responsables des lésions tissulaires associés à la pathologie (Borda et al 1984 ; Cunha-Neto et al 1995 ; Marin-Neto et al 2007).

Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués durant la physiopathologie de l'infection à *T. cruzi* a permis l'identification de molécules qui pourraient s'avérer être des biomarqueurs de la progression de la pathologie. De plus, d'autres marqueurs « non spécifiques » de *T. cruzi* (marqueurs métaboliques, marqueurs de l'inflammation...) pourraient également être utiles pour l'évaluation de l'état d'aggravation de la pathologie (Requena-Méndez et al 2013 ; Pinazo et al 2014).

Pourtant, d'autres travaux doivent encore être effectués pour valider ces marqueurs et aussi pour comprendre pourquoi certaines personnes chagastiques asymptomatiques vont développer les complications de la Maladie. A ce jour, aucun marqueur ne permet de prévoir un tel scénario avec certitude.

#### I.1.4.5. Les mécanismes d'échappement de *T. cruzi*

*T. cruzi* a développé de multiples stratégies afin d'échapper au système immunitaire et ainsi persister chez l'hôte. Lorsque les formes trypomastigotes métacycliques ont pénétré chez l'hôte via les muqueuses ou une blessure au niveau de la peau, elles peuvent :

(i) infecter de façon active de nombreuses cellules non-phagocytaires, présentes au niveau du site d'infection, grâce à la présence de glycoprotéines de la famille des mucines présentes à la surface de la matrice extracellulaire du parasite. Ces glycoprotéines permettent l'adhésion et la pénétration du parasite dans la cellule hôte suite au recrutement des lysosomes, entraînant ainsi la formation d'une vacuole parasitophore issue de la fusion avec la membrane plasmique du parasite (Buscaglia et al 2006 ; Tardieux et al 1992). Le pH acide à l'intérieur de la vacuole parasitophore va entraîner l'activation de trans-sialidases ancrées sur la matrice extracellulaire, et le transfert des molécules d'acide sialique, présentes en grande

quantité au niveau de la membrane interne du lysosome, vers la matrice extracellulaire du parasite. C'est ainsi, en plus de la sécrétion de protéines formant des pores, comme l'hémolysine, induite par le milieu acide de la vacuole, que le parasite fragilise la membrane de la vacuole, s'échappe rapidement dans le cytoplasme de la cellule hôte et se protège de l'action des enzymes protéolytiques de l'hôte (Albertti et al 2010 ; Andrews 1990).

(ii) être internalisées de façon passive par les cellules phagocytaires de l'hôte. Les macrophages résidents au niveau du site d'infection sont les premières à interagir avec le parasite (Burleigh et al 1995). La reconnaissance de motifs de la matrice extracellulaire parasitaire va entraîner l'internalisation de façon passive dans les macrophages et l'activation de la voie de la NADPH oxydase permettant la production de radicaux superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) dans le phagolysosome. (Fridovich I. 1995). En parallèle, la production de cytokines inflammatoires  $IFN\gamma$  et  $TNF\alpha$  déclenchée par l'infection va également stimuler les macrophages infectés en activant la voie iNOS qui va conduire à la formation et à la diffusion d'oxyde nitrique ( $NO^{\cdot}$ ) dans le phagolysosome (Munoz-Fernandez et al 1992). Le  $NO^{\cdot}$  peut réagir avec les radicaux superoxydes  $O_2^{\cdot-}$  et former du peroxyde d'azote ( $ONOO^-$ ) une molécule cytotoxique très efficace pour tuer le parasite (Alvarez et al 2011). De plus, l'infection va entraîner l'activation de la voie alterne du complément via la fixation de la molécule C3b à la surface de *T. cruzi* et permettre ainsi l'opsonisation (lyse du parasite par les anticorps lytiques) et la reconnaissance du parasite par les macrophages. *T. cruzi* possède un arsenal d'enzymes anti-oxydantes et des SOD (*Superoxide dismutase*), activées par l'environnement extrêmement oxydatif du phagolysosome, permettant au parasite de s'échapper vers le cytosol du macrophage (Piacenza et al 2009). Cinq peroxydases (*TcCPX*, *TcMPX*, *TcAPX*, *TcGPXI* et *TcGPXII*) produites dans différents compartiments du parasite (le cytosol, la mitochondrie et le réticulum endoplasmique) ont une action de protection contre les molécules hyperoxydantes ( $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$  et  $ONOO^-$ ) produites par le macrophage (Piacenza et al 2008). Quatre SOD, produites dans la mitochondrie ou au niveau des glycosomes, peuvent neutraliser les effets toxiques des radicaux superoxydes et inhiber la formation de  $ONOO^-$  (Fridovich I. 1995 ; Mateo 2008). Un macrophage infecté à un ratio de 5:1 peut contrôler l'infection et tuer les parasites. Par contre, à un ratio de 10:1, le macrophage est détruit par les parasites (Kress et al 1975). Bien que de nombreux parasites sont détruits par les macrophages au tout début de l'infection, certains vont pouvoir s'échapper du phagolysosome et se différencier en formes amastigotes répliquatives dans le cytosol du macrophage.

Après plusieurs tours de réplication des formes amastigotes ayant pu atteindre le cytoplasme d'une cellule non phagocytaire ou le cytosol du macrophage, les parasites se différencient en formes infectantes trypanomastigotes mobiles qui vont pouvoir, après rupture de la membrane plasmique de la cellule hôte, à leur tour infecter d'autres cellules voisines ou atteindre la circulation sanguine.

Durant la phase précoce de l'infection, les parasites ayant atteint la circulation sanguine vont être la cible, entre autre, du système du complément, mécanisme de défense de l'immunité innée pouvant être activée par 3 voies : le voie classique, la voie des lectines et la voie alterne. Pour échapper au système du complément, *T. cruzi* possèdent de nombreuses molécules

permettant d'inhiber ces 3 voies (Osorio et al 2012). Les principales sont (i) la calréticuline, protéine de 45 Kda présente à la surface du parasite, peut se lier à la lectine MBL (*Mannan Binding Protein*), aux ficolines et à la protéine C1 et inhiber la voie des lectines et la voie classique du complément, respectivement, (ii) La CRP (*Complement Regulatory Protein*) ou GP160 est une protéine de surface ancrée-GPI capable d'inhiber la voie classique et la voie alterne du complément en se fixant sur les protéines C3b et C4b (Ferreira et al 2004 ; Sosoniuk et al 2014 ; Norris et al 1991 ; Beucher et al 2008). D'autres protéines parasitaires (CRIT, T-DAF et gp58/68) sont également capables d'inhiber le système du complément (Cestari Idos et al 2008 ; Tambourgi et al 1993 ; Fischer et al 1988). Ainsi, *T. cruzi* est capable d'inhiber les étapes d'initiation de la cascade du complément et la formation de la C3 convertase, étape clé des 3 voies du système du complément. L'inhibition de la C3 convertase va entraîner une diminution de la formation de C3b qui est une opsonine permettant l'induction de la phagocytose.

La matrice extracellulaire de *T. cruzi* présente à sa surface un polymorphisme élevé de glycoprotéines et de mucines ancrées par une structure GPI à la membrane plasmique (Buscaglia et al 2006). Ces protéines de surface nommées MASP pour *Mucin-Associated Surface Proteins* sont codées par des familles multigéniques représentant environ 6% des gènes par génome diploïde (Bartholomeu et al 2009). Les MASP sont caractérisées par des domaines N et C-terminal très conservés et des domaines centraux présentant des régions variables et des régions répétées. De plus, les gènes sont particulièrement exprimés par les formes trypanostigotes. Ainsi, la diversité d'antigènes présentés « au même moment » au niveau de la matrice extracellulaire de *T. cruzi* retarderait la mise en place d'anticorps spécifiques neutralisants ainsi qu'une réponse cellulaire cytotoxique de type T CD8+ et permettrait aux parasites d'échapper au système immunitaire de l'hôte et d'infecter les cellules cibles (Tarleton RL 2007).

Une autre stratégie mise en place par différents microorganismes dont les trypanosomes est l'activation polyclonale lymphocytaire. Chez *T. cruzi*, cette activation a lieu dès le début de l'infection. Elle est caractérisée par une prolifération massive et une différenciation terminale de toutes les classes lymphocytaires B et T, jusqu'à 5 à 7 fois le niveau normal, au niveau des organes lymphoïdes primaires et secondaires (rate, ganglions) ainsi que dans la circulation (Minoprio et al 1986). Dans le modèle murin, il a été démontré que l'activation polyclonale des lymphocytes B est encore retrouvée 6 mois après la primo-infection (d'Imperio Lima et al 1986). Chez des patients chagasiques en phase chronique asymptomatique ou manifestant une cardiopathie chagastique, des taux sériques élevés de lymphocytes B et T activés ont été retrouvés démontrant que l'activation polyclonale perdure jusqu'à la phase chronique (Dutra et al 1994). Plus de 95% des lymphocytes B activés ne sont pas spécifiques de *T. cruzi* et la majorité des anticorps produits par les cellules spléniques ne ciblent pas le parasite (Minoprio et al 1988). Concernant les lymphocytes T, l'analyse du répertoire des lymphocytes T CD8+ a montré une expression préférentielle des familles V $\beta$ 5 et V $\beta$ 14 caractéristique d'une activation par des molécules super-antigéniques (Leite-de-Moraes et al 1994). Ainsi, la mise en place tardive d'une réponse immunitaire spécifique va permettre la survie du parasite,

point crucial au début de l'infection, et son échappement dans les tissus cibles (Bermejo et al 2011).

Plusieurs molécules de *T. cruzi* ont été décrites comme pouvant activer de façon polyclonale et non spécifique les lymphocytes B. Ces molécules sont des mitogènes B, c'est à dire des molécules souvent de nature protéique capables de stimuler les lymphocytes B en dépit de leur spécificité de récepteur. Plusieurs molécules parasitaires ont été décrites comme des mitogènes pour les cellules B. La protéine *Tc24*, un antigène excréteurs/sécréteurs (ESA) est activateur polyclonal pour les cellules B (Da Silva et al 1998). Une malate deshydrogénase mitochondriale de *T. cruzi* (mMDH), les trans-sialidases et les structures GPI (*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*) et plus récemment une glutamate déshydrogénase (GDH) présentent au niveau de la matrice extracellulaire de *T. cruzi*, peuvent activer de façon polyclonale les cellules B (Montes et al 2002 ; Gao et al 2002 ; Montes et al 2006). Et, de façon intéressante, une enzyme excrétée/sécrétée par les formes infectantes de *T. cruzi* a été décrite comme un mitogène B indépendant des cellules T : la *Trypanosoma cruzi* proline racemase ou *TcPRAC* (Reina-San-Martin et al 2000).

## I.2. LA *TRYPANOSOMA CRUZI* PROLINE RACEMASE (*TcPRAC*)

Le laboratoire a mis en évidence la sécrétion d'un mitogène B par les formes métacycliques trypanostigotes de cultures de la souche de référence CL Brener. Un mitogène B est capable d'activer de façon polyclonale toutes les populations lymphocytaires B dont la majorité des anticorps produits sont non-spécifiques. La caractérisation de ce mitogène a permis de démontrer qu'il possède également une activité enzymatique racémase pour la proline c'est à dire capable d'interconvertir les énantiomères L et D de cet acide aminé. Ce mitogène et enzyme : la *Trypanosoma cruzi* proline racémase (*TcPRAC*) est la première proline racémase décrite chez les eucaryotes (Reina-San-Martin et al 2000).

Les séquences nucléotidique et peptidique de la *TcPRAC* ont une homologie de 57% avec la proline racémase de *Clostridium sticklandii* (*C. sticklandii*) avec conservation de la séquence au niveau du site actif pour les 2 racémases (Reina-San-Martin et al 2000). La production de la *TcPRAC* recombinante chez *E. coli* a montré (i) une activité mitogénique pour les cellules B indépendamment d'une réponse cellulaire T (ii) une activité racémase indépendante de cofacteur, uniquement pour l'acide aminé proline. L'utilisation du seul inhibiteur compétitif du substrat proline, connu et décrit pour la proline racémase de *C. sticklandii*, le pyrrole-2-carboxylique acide (PYC) inhibe bien l'activité enzymatique de la *TcPRAC* (Reina-San-Martin et al 2000). La structure cristallographique de la *TcPRAC* a validé le fait que la *TcPRAC* est un homodimère dont chaque sous-unité possède un site actif (Chamond et al 2003 ; Buschiazzi, Goytia et al 2006). La présence du PYC au niveau d'un des sites actifs entraîne un changement de conformation. Le remplacement d'au moins une des deux cystéines catalytiques, essentielles car impliquées dans le transfert de protons permettant l'inter-conversion de la forme L à la forme D et vice-versa de la proline, par une sérine afin d'éviter un changement de conformation de l'enzyme, entraîne la perte de l'activité enzymatique de la *TcPRAC* mais pas de l'activité mitogénique (Chamond et al 2003). Par contre, la présence de l'inhibiteur de la *TcPRAC* entraîne la perte de son activité mitogénique ce qui montre que les épitopes responsables de l'activité mitogénique de la *TcPRAC* sont de type conformationnel.

L'organisation génomique et l'étude des transcrits de la *TcPRAC* pour la souche CL Brener ont montré l'existence d'au moins 2 copies du gène par génome haploïde situés dans les régions chromosomiques VII (région correspondant à au moins 3 chromosomes de tailles similaires) et V (Chamond et al 2003) selon la nomenclature de Cano et al. 1995 : (i) le gène *TcPRACA* pouvant être à l'origine d'une isoforme d'une taille de 45KDa possédant une séquence signal peptidique de sécrétion et d'une isoforme d'une taille de 39KDa pouvant être générée grâce à un mécanisme d'épissage alternatif en trans (ii) le gène *TcPRACB* codant pour un isoforme monomérique de 39Kda présentant 7 acides aminés différents avec l'isoforme de 39 KDa issu du gène *TcPRACA*. Les 2 gènes paralogues sont bien transcrits à tous les stades de développement du parasite. De plus, la localisation de la *TcPRAC* est majoritairement cytoplasmique pour les formes non infectantes du parasite alors qu'elle est plutôt concentrée au niveau de la poche flagellaire et de la membrane pour les formes infectantes (Reina-San-Martin et al 2000 ; Chamond et al 2003, Chamond et al 2005).

Des analyses phylogénétiques récentes sur différentes souches représentatives des 6 génotypes de *T. cruzi* ont montré que les souches des génotypes *TcI* à *TcIV* possèdent une copie du gène *TcPRAC* par génome haploïde alors que les souches hybrides classées dans les génotypes *TcV* et *TcVI*, dont la souche CL Brener (*TcVI*), possèdent les gènes *TcPRACA* et *TcPRACB* issus des souches parentales des génotypes *TcII* (gène *TcPRACA*) et *TcIII* (gène *TcPRACB*) (Caballero et al 2015). Excepté pour la souche CL Brener, aucune séquence signal de sécrétion n'a été mise en évidence parmi les différentes souches étudiées.

La *TcPRAC* est un facteur de virulence pour *T. cruzi* car l'obtention de mutants fonctionnels stables hyperexprimants soit le gène *TcPRACA* ou *TcPRACB* a montré que ces derniers se différencient plus en formes infectantes métacycliques et présentent une infectivité accrue *in vitro*. L'impossibilité d'obtenir des mutants n'exprimant plus le gène *TcPRACB* suggère fortement le caractère essentiel de l'enzyme pour la survie du parasite (Chamond et al 2005).

Les données montrant une diminution de la multiplication des parasites à l'intérieur des cellules *in vitro* en présence de l'inhibiteur PYC suggèrent que la *TcPRAC* pourrait être une cible pour le développement d'une nouvelle thérapie contre la Maladie de Chagas. Par bio-informatique, un modèle virtuel représentant les différents états de transition possible de l'enzyme de sa forme « libre » ou « liée », c'est à dire présence de l'inhibiteur au niveau du site catalytique a permis l'identification de nouveaux inhibiteurs (Berneman et al 2013).

Le laboratoire a mis en évidence une signature des proline racémases par la présence indispensable de 2 motifs peptidiques qui sont le motif MCGH et le motif III (encadrant la séquence du site actif SPCGT) et qui possèdent les 2 résidus cystéine catalytiques intervenant dans la réaction de racémisation (Chamond et al 2003). De plus, 3 résidus nommés R1, R2 et R3 permettent de discriminer la spécificité du substrat entre les proline racémases et les hydroxyproline épimérase comme par exemple le résidu majeur R1 qui se trouve être l'acide aminé aromatique Phénylalanine dans les séquences des Proline Racémase et qui engendrent des contraintes de charges sur l'accessibilité du substrat au niveau du site actif et permet uniquement l'accès à la Proline et non à l'hydroxy-Proline (Goytia et al 2007). Une étude sur la recherche des gènes homologues des Proline racémases a montré que les motifs MCGH et MIII et les résidus R1, R2 et R3, parmi les différentes souches de *T. cruzi* étudiées, représentatives des 6 génotypes (*TcI* à *TcVI*), étaient parfaitement conservés (Caballero et al 2015).

Enfin, la présence de gènes homologues fonctionnels de la *TcPRAC* retrouvés uniquement dans le genre *Trypanosoma* chez les Eucaryotes (absents des espèces du genre *Leishmania*) serait due à un transfert de gène horizontal d'origine bactérienne de la classe des Bacilles à un ancêtre commun au genre *Trypanosoma*. L'absence de Proline Racémase chez les autres trypanosomes pathogènes pour l'Homme (*T. brucei* spp) serait due à une perte du gène au cours de leur évolution (Caballero et al 2015). De façon intéressante, chez le parasite non-pathogénique *T. rangeli*, présent dans les mêmes zones d'endémie que *T. cruzi* et plus proche génétiquement de ce dernier que des espèces de *T. brucei*, les séquences homologues de proline racémases sont des pseudogènes car ces dernières sont interrompues par des codons stop.

### I.3. LES TESTS DIAGNOSTIQUES POUR LA MALADIE DE CHAGAS

De nombreuses méthodes diagnostiques existent pour mettre en évidence, de façon directe ou indirecte, la présence du parasite. Pourtant, encore aujourd'hui des difficultés subsistent. Le parasite est retrouvé en quantité significative dans la circulation sanguine seulement pendant la phase aiguë, c'est à dire environ pendant les deux premiers mois de l'infection. Durant la phase chronique très peu de parasites sont circulants, c'est pour cela que beaucoup de tests souffrent d'une bonne sensibilité de détection. Dans les zones d'endémie, principalement rurales, les centres de santé sont peu nombreux et/ou fonctionnent avec de faibles moyens. La majorité des personnes infectées sont asymptomatiques et/ou ne consultent pas. De plus, les variabilités génétiques entre les différentes souches du parasite et la possibilité de coinfection par d'autres parasites présents dans les zones d'endémie de la Maladie de Chagas tels que *Trypanosoma rangeli* (parasite non pathogène pour l'Homme) ou *Leishmania* spp posent encore des problèmes de spécificité pour les tests existants.

#### I.3.1 Les tests diagnostiques directs

L'examen direct d'un prélèvement de sang par microscopie entre lame et lamelle, ou par frottis ou goutte épaisse après fixation et coloration, permet de déterminer la présence du parasite grâce à ses caractéristiques morphologiques : taille, forme, présence d'un flagelle et d'un kinétoplaste. Des techniques de concentration par centrifugation ou par centrifugation en tube capillaire afin de rechercher le parasite au niveau de l'interface globules blancs / globules rouges, permettent d'augmenter les chances de détection du parasite (Feilij et al 1983). Ainsi, la microscopie optique reste le standard de référence pour poser le diagnostic de la Maladie durant la phase aiguë ou en cas de suspicion d'infection congénitale (Freilij et al 1995). Les taux de sensibilité obtenus par ces méthodologies sont cependant de l'ordre de 80 à 90 % (Gomes et al 2009).

Il existe des techniques d'amplification *in vitro* et *in vivo* pour augmenter le nombre de parasites circulants prélevés, souvent faible durant la phase chronique. L'hémoculture permet la multiplication *in vitro* du parasite. Trois milieux sont couramment utilisés (i) le milieu BHI (infusion cœur-cerveau), (ii) le milieu LIT (*Liver Infusion Tryptose*) qui est également utilisé pour la culture des formes épimastigotes non infectantes retrouvées dans l'insecte vecteur et (iii) le milieu de Warren (mélange de milieu LIT, RPMI 1640 et milieu 199). Les hémocultures permettent d'augmenter la sensibilité de 30 à 60 % après 120 jours de mise en culture (Luz et al 1994). Le xénodiagnostic, proposé par Emile Brumpt, est une technique d'amplification *in vivo* pratiquée uniquement dans la zone d'endémie (Brumpt E. 1914). Des triatomés non infectés, contenus dans des petites boîtes, sont appliqués sur plusieurs zones cutanées de l'individu (essentiellement sur les bras). La recherche du parasite se fait ensuite dans les déjections des insectes 1 à 2 mois après la pause sur l'individu. L'avantage de cet examen, bien que de moins en moins pratiqué car assez contraignant et mal supporté par le patient, est le seul (avec les hémocultures) qui permet de recueillir le parasite vivant chez un patient chagasiq en phase chronique. Les inconvénients majeurs de ces deux méthodes sont le temps d'obtention des résultats et le manque de sensibilité.

Il n'existe pas aujourd'hui de trousse commerciale utilisant la technique de PCR pour le diagnostic de la Maladie de Chagas car aucun « gold standard » n'a été définie pour cette technique. Différents couples d'amorces, utilisés dans différents laboratoires de Recherche, ciblant soit l'ADN génomique du parasite (TcZ1/TcZ2, BP1/BP2, O1/O2, Tca1/Tca2) soit l'ADN du kinétoplaste (121/122, S35/S36) ont été testées et comparées (Virreira et al 2003). Le couple d'amorces TcZ1/TcZ2 qui reconnaît une séquence répétée de 195pb correspondant au gène du mini-exon présent dans l'ADN génomique nucléaire de *Trypanosoma cruzi* permet l'amplification d'une bande de 188pb avec un taux de sensibilité plus élevé que celui obtenu par les techniques microscopiques, pendant la phase aigüe (Moser et al 1989 ; Kirchhoff et al 1996). Pourtant, d'autres études ont montré que ces amorces pouvaient amplifier du matériel génétique autre que celui de *T. cruzi* ou produire de faux positifs (Moser et al 1989 ; Castro et al 2002 ; Qvarnstrom et al 2012). Les amorces ciblant l'ADN du kinétoplaste ne permettent pas l'amplification de toutes les lignées de *T. cruzi* et celles ciblant l'ADN génomique ont montré des taux de spécificité inférieurs car peuvent amplifier l'ADN d'autres parasites tels que *T. rangeli* et *Leishmania* spp (Qvarnstrom et al 2012 ; Vallejo et al 1999). Par PCR en temps réel, la détection d'une séquence satellite répétée présente dans l'ADN nucléaire du parasite permettrait de détecter et quantifier l'équivalent de 0,1 parasite par millilitre de sang (Duffy et al 2009). Une révision concernant 26 méthodes de PCR en temps réel utilisant des séquences satellites répétées de l'ADN nucléaire ou des séquences présentes dans l'ADN du kinétoplaste ont validé le potentiel de cette technique pour la quantification du parasite chez des malades infectés en phase aigüe et en phase chronique (Ramirez et al 2015). Pourtant, des améliorations de ces tests sont nécessaires afin d'augmenter le taux de sensibilité qui est actuellement de 80% pour la phase d'un diagnostic d'un individu asymptomatique en phase chronique (Ramirez et al 2015). Les principaux facteurs limitants sont la quantité de sang importante à prélever et cela à plusieurs reprises à cause d'une parasitémie très fluctuante durant la phase chronique de la Maladie. De plus, c'est une technique onéreuse nécessitant du matériel spécifique, et difficile à mettre en place dans les centres de Santé sur le terrain.

### I.3.2. Les tests sérologiques indirects

La majorité des personnes infectées par *T. cruzi* développe au cours de l'infection une réponse immunitaire adaptative, en particulier des anticorps dirigés contre le parasite. Ainsi, la détection de ces anticorps démontre le contact d'un individu avec l'agent étiologique de la Maladie de Chagas. C'est pourquoi, plusieurs trousse commercialisées proposent des techniques faciles à mettre en place à des coûts relativement faibles telles que l'Immunofluorescence indirecte (IFI), le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) et le test ELISA pour le diagnostic de la Maladie.

Les premiers tests diagnostics sérologiques à avoir été mis au point utilisent des extraits protéiques totaux provenant de différents stades de développement du parasite ou des fractions antigéniques purifiées. Le test utilisant les antigènes excrétés/secrétés des formes trypomastigotes (*Trypomastigote Excreted/Secreted Antigens* TESA) semble le plus performant pour le diagnostic de la Maladie durant la phase chronique (Umezawa et al 1996).

Les laboratoires biolab-Mérieux S.A ont commercialisé un test nommé TESA-blot, recommandé par l'OMS comme test de confirmation (WHO Report 2010).

Le criblage de banques de phages produites à partir d'ADN génomiques ou à partir d'ADN complémentaires (générés par rétrotranscription des ARNm totaux des formes épimastigotes et trypomastigotes de *T. cruzi*) issus de sérums de malades ou de sérums d'animaux de laboratoire infectés, a permis le clonage et la production de séquences peptidiques correspondant à des antigènes exprimés par *T. cruzi*. Certains gènes ainsi identifiés ont montré qu'ils codaient pour des peptides répétés organisés en tandem. Ces gènes sont très conservés entre les différentes souches et lignées de *T. cruzi* comme par exemple le peptide de 68 acides aminés FRA (*flagellar repetitive antigen*) et le peptide de 14 acides aminés CRA (*cytoplasmic repetitive antigen*) (Cotrim et al 1995). Ces antigènes ont dans un premier temps été testés en individuel sur différentes cohortes bien établies, sous formes recombinantes ou sous formes de peptides synthétiques. Les résultats obtenus ont montré de très bon taux de spécificité pour certains antigènes testés, jusqu'à 100% pour certains. Par contre, les taux de sensibilité obtenus étaient inférieurs aux tests utilisant des préparations protéiques totales du parasite (Ibanez et al 1987 ; Cotrim et al 1990 ; Burns et al 1992). L'utilisation simultanée de différents antigènes recombinants et/ou peptides synthétiques a permis d'augmenter la sensibilité de détection de certains tests (Houghton et al 1999 ; Da Silveira et al 2001 ; Hernandez et al 2010). Par exemple, le test ELISA utilisant le mélange des 2 antigènes recombinants répétés CRA+FRA testé sur 524 sérums humains a montré 100% de spécificité et 98,3% de sensibilité (Carvalho et al 1993). Plus récemment, un nouveau test nommé Multi-cruzi en phase finale de développement, qui utilise 12 antigènes différents « imprimés » sur des puits de plaques ELISA et une analyse algorithmique via un arbre décisionnel permet de déterminer les sérums négatifs ou positifs tout en discriminant les sérums « faux-positifs » (Granjon et al 2016).

### I.3.3. Les critères d'évaluation d'un test diagnostique

Un test est considéré comme approprié pour un diagnostic quand il permet de diminuer le taux d'incertitude lors d'un jugement clinique. La maîtrise précise des caractéristiques d'un test doit permettre une interprétation correcte d'un cas de patient et d'instruire le médecin sur les suites à donner. Il peut être difficile de répondre formellement à la question : « un individu est-il malade ou non ? ». Dans cette optique, l'utilisation d'un « biomarqueur » bien défini pourrait permettre d'évaluer un processus physiopathologique, une pathologie ou l'efficacité à un traitement donné. Le dosage précis d'un biomarqueur dans un échantillon biologique pourrait donc permettre de poser un diagnostic, de suivre le développement d'un processus infectieux et/ou pathologique ainsi que d'estimer un pronostic et de surveiller les réponses à une chimiothérapie.

Comment évaluer les performances d'un test diagnostique ? Plusieurs étapes méthodologiques ont été définies pour valider un test de façon efficace (Sackett & Haynes 2002). Dans un premier temps, si les résultats du test diffèrent entre les individus « malades » et les individus « non malades » et sont en accord avec la probabilité qu'un individu soit

atteint de la pathologie alors il y a un intérêt à évaluer ce test dans une population donnée. C'est à dire, d'une part apprécier la valeur du test par la détermination du nombre d'individus « malades » et d'autre part analyser les performances du test dans un contexte idéal où la population sélectionnée est bien définie. Dans un deuxième temps, il est important de savoir si le test est capable de bien distinguer les individus « malades » parmi les « non malades » dans un groupe d'individu dont les signes cliniques suspectent la pathologie en question. De plus, il est recommandé de prendre en compte les avantages du test diagnostique dans l'amélioration de l'état général du patient suite à un traitement adapté. Ce questionnement fait appel à la notion « d'utilité » car permet également de valider l'impact des résultats du test sur l'amélioration de l'état de santé du patient.

Comme décrit ci-dessus, plusieurs caractéristiques sont donc à prendre en compte dans l'évaluation du test diagnostique visant son autorisation de mise sur le marché (AMM) : le respect des bonnes pratiques et la comparaison des résultats obtenus par le nouveau test par rapport à une méthode diagnostique de référence existante i.e. le « gold standard ». Ainsi, les caractéristiques intrinsèques du test sont estimées telles que la sensibilité et la spécificité, les rapports de vraisemblance et le test de réponse quantitative qui permet la détermination d'un seuil grâce à la représentation graphique sous la forme de courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*). D'autres informations, cette fois-ci extrinsèques, sont déterminées : les valeurs prédictives relatives à la « positivité » et à la « négativité » ainsi que la prévalence. Un tableau dit de « contingence » (voir Figure 3) peut être conçu avec les résultats du test obtenus sur des échantillons dont le nombre doit respecter les critères définis pour chacune des phases :

- i. Phases pré-cliniques : données *in vitro* puis *in vivo* sur le modèle expérimental.
- ii. Phases cliniques chez l'homme :
  - Phase I : de 20 à 80 individus
  - Phase II : étude pilote, sur un échantillon inférieur à 500 individus, qui détermine les performances « positivité / négativité » du test
  - Phase III : étude pivot, sur au moins 1000 individus, qui compare l'efficacité du test par rapport à celui de référence
  - Phase IV : dernière phase avant l'AMM

Le résumé des critères et des données permettant de confirmer ou d'infirmer la pertinence et la fiabilité d'une étude pilote ou pivot est présenté dans le tableau de contingence :

Figure 3 : Tableau de contingence

	Examen de Référence*		Nombre
	Malade	Non-malade	
Test (+)	VP	FP	n1
Test (-)	FN	VN	n0
Somme	m1	m0	n

\* VP = vrais positifs ; VN = vrais négatifs ; FP = faux positifs et FN = faux négatifs.

A partir de l'agencement des résultats obtenus dans le tableau de contingence, il est donc possible de calculer la « prévalence » définie comme  $m/n$ , la « sensibilité » définie comme  $VP/m1$  et la « spécificité » égale à  $VN/m0$ . Le rapport de vraisemblance permet d'obtenir des informations prédictives importantes, notamment les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN) c'est à dire la probabilité d'être malade sachant que le test est positif ou que le test est négatif respectivement. Ces valeurs sont calculées à partir des formules suivantes :

$$VPP = VP/(VP + n1)$$

et

$$VPN = VN/(VN/n0)$$

#### I.3.4. Vers le développement de nouveaux marqueurs diagnostiques et de suivi post-traitement

Bien que d'énormes efforts ont été fournis dans le but d'obtenir un test sérologique 100% spécifique et 100% sensible pour le diagnostic de la Maladie de Chagas, des travaux restent encore à faire pour l'obtention d'un tel test. Les tests diagnostics commercialisés ont fait l'objet d'un rapport de l'OMS (WHO Report 2010). Les taux de sensibilité et de spécificité énoncés par les fabricants des différents tests commercialisés sont supérieurs à 98% - 99%. Pourtant ils ne reflètent pas toujours la réalité diagnostique sur le terrain où l'on est encore confronté à des problèmes de faux positifs ou de faux négatifs, principalement pour des raisons de réactions croisées avec d'autres trypanosomatidés (*T. rangeli* et *Leishmania spp*) mais aussi à cause de la diversité génétique des multiples souches de *T. cruzi* réparties sur tout le continent sud américain. Pour ces raisons, les recommandations de l'OMS, préconisant l'utilisation d'au moins deux techniques différentes pour le diagnostic d'une suspicion clinique, d'une infection congénitale ou pour l'évaluation d'une guérison post-traitement, restent inchangées (voir Figure 4).

Laboratory diagnosis of Chagas disease					
Objectives	Serological and molecular methods				
	Conventional			Non-conventional	
	ELISA	IIF	IHA	Recombinant antigens	PCR
Serological evidence (two tests recommended)	X	X	X	X	
Blood-bank screening (one test recommended)	X				
Transplacental and perinatal transmission (two tests recommended)	X	X		X	X
Epidemiological surveys (one test recommended)	X	X			
Treatment follow-up (two tests recommended)	X	X	X		X

**Figure 4 : Tableau des recommandations de l'OMS pour le diagnostic de la Maladie de Chagas.** Control of Chagas Disease. Second report of the WHO Expert Committee, 2002.

Due à la complexité physiopathologique de la Maladie de Chagas, la recherche et la validation de marqueurs qui permettraient (i) de prévoir quels seront les patients chagasiques asymptomatiques qui développeront les complications sévères de la Maladie, (ii) d'évaluer à court terme l'efficacité d'un traitement (iii) ou encore de détecter de façon précoce le début de la phase chronique symptomatique (cardiopathie, manifestations digestives) est un challenge évident. A ce jour, le « gold standard » permettant de se prononcer sur la bonne voie de guérison d'un malade reste la négativation des tests sérologiques conventionnels également utilisés pour le diagnostic de la Maladie. Or, il a été démontré que la séroconversion des anticorps dirigés contre le parasite pouvait prendre plusieurs années après la fin d'un traitement, pour des raisons encore mal établies (Cançado JR 2002 ; Viotti et al 2011).

L'évaluation des titres d'anticorps développés contre certains antigènes parasitaires a mis en évidence que ces derniers présenteraient de meilleures performances pronostiques que ceux utilisés pour les tests sérologiques conventionnels. Des anticorps dits « lytiques » (i.e. *lytic antibodies*) entraînent la lyse des formes trypomastigotes via l'action du complément (Kretzli et Brener 1976). Ils sont retrouvés à un taux particulièrement élevés chez les patients chagasiques chroniques asymptomatiques et auraient un rôle sur le contrôle de l'infection. Chez des patients traités, les titres de ces anticorps deviennent négatifs alors que les tests sérologiques conventionnels restent positifs (Galvao et al 1993 ; Kretzli AU 2009). Cette séroconversion semblerait indiquer l'éradication du parasite et de fait pourrait être utilisé comme marqueur de « cure » (Zulantay et al 1998).

Une baisse significative et plus précoce du titre d'anticorps spécifiquement dirigés contre certaines protéines parasitaires recombinantes telles que la rTc24, la rCRP (*Complement Regulatory Protein*) ou encore des antigènes considérés comme « immunodominants », tels que KMP11/PFR2/HSP70/Tgp63, a été démontrée dans des sérums de patients « traités » (Krautz et al 1995 ; Meira et al 2004 ; Fernandez-Villegas et al 2011). D'autres équipes ont démontré que des isotypes particuliers IgG<sub>2</sub> et/ou des IgA dirigés contre les antigènes FRA et/ou CRA étaient retrouvés en plus grande quantité et de façon significative chez des patients présentant une cardiomyopathie ou des complications digestives de la Maladie respectivement (Verçosa et al 2007 ; Vasconcelos et al 2011). Ces anticorps pourraient servir de marqueurs pour déterminer la progression de la Maladie.

Enfin, pour déterminer l'efficacité des traitements chez des patients chagasiques chroniques, les techniques de PCR permettant l'identification directe du parasite par l'amplification de gènes spécifiques ont démontré les meilleures performances au niveau sensibilité et temps de réponse (Britto et al 1999 ; Fernandes et al 2009). Toutefois, sachant que la parasitémie pendant la phase chronique est fluctuante et très peu élevée, une PCR négative ne peut signifier à 100% que le patient a été guéri. Ainsi, il est recommandé d'effectuer plusieurs tests à différents temps d'intervalle pour valider l'efficacité des traitements (Murcia et al 2010).

### I.3.5. Développement de nouveaux outils : anticorps conventionnels « versus » V<sub>H</sub>H

Les anticorps assurent la réponse immunitaire adaptative de type humorale chez les vertébrés supérieurs en assurant, entre autre, la reconnaissance spécifique d'un antigène. Chez les mammifères, la majorité des anticorps retrouvés dans le sérum sont les immunoglobulines de type IgG qui sont des glycoprotéines, produites exclusivement par les cellules B, retrouvés soit à la surface du lymphocyte B soit sous forme soluble, sécrétés par les plasmocytes.

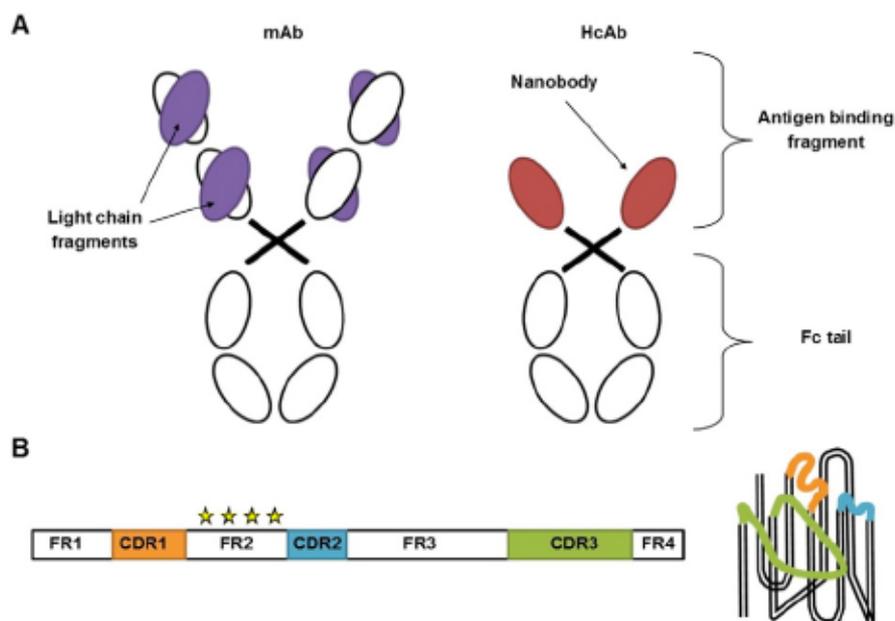
En forme d'Y, les IgG sont composées de quatre sous-unités polypeptidiques identiques deux à deux : deux chaînes lourdes nommées H (*heavy chain*) et deux chaînes légères nommées L (*light chain*). Au niveau N-terminal des chaînes lourdes et légères, on retrouve des domaines présentant des séquences variables nommés V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub>. La région impliquée dans la reconnaissance et la fixation de l'antigène : le Fab (*fragment antigen binding*) est constituée par la combinaison d'un domaine V<sub>H</sub> avec un domaine V<sub>L</sub>. Chaque domaine V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> possède trois boucles hypervariables nommées CDR1, CDR2 et CDR3 (*complementary determining regions*) assurant la complémentarité avec l'épitope de l'antigène. Ces trois régions sont encadrées par quatre régions plus conservées nommées FR (*framework regions*) assurant la stabilité des domaines variables. Au niveau C-terminal, on retrouve trois domaines constants pour les chaînes lourdes nommés C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> et C<sub>H3</sub> et un domaine constant nommé C<sub>L</sub> pour les chaînes légères. Ces domaines constants sont impliqués dans les fonctions effectrices comme la fixation du complément.

Les IgG sont les protéines les plus étudiées et les mieux caractérisées. Elles sont très utilisées dans les domaines du diagnostique et de la thérapeutique. L'immunisation d'animaux de laboratoire avec un antigène permet l'obtention d'anticorps polyclonaux (plusieurs anticorps reconnaissant différents épitopes de l'antigène) ou d'anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope unique. Les progrès en génie génétique ont permis de s'affranchir de la contrainte de taille d'une IgG conventionnelle (150 KDa) en élaborant des anticorps recombinants correspondant à différents fragments polypeptidiques issus d'une IgG conventionnelle, de plus petites tailles mais toujours capables de reconnaître l'antigène tels que les Fab (57 KDa) pour *fragment antigen binding* et les scFv (27 KDa) pour *single-chain variable fragment* qui correspondent uniquement aux domaines variables V<sub>H</sub> et V<sub>L</sub> du Fab (Nelson AL 2010).

Par ailleurs, des anticorps composés uniquement de chaînes lourdes : les HcAbs (*heavy-chain only antibodies*) coexistent avec des immunoglobulines « conventionnelles » chez les Camélidés (Hamers-Casterman et al. 1993). L'originalité de ces HcAbs est que la zone correspondant au paratope est constituée d'un domaine variable unique nommé V<sub>H</sub>H (*variable domain of heavy-chain only*) présentant les mêmes caractéristiques de diversité de répertoire que les anticorps « classiques » des mammifères. Le V<sub>H</sub>H d'une taille d'environ 15 KDa est le plus petit fragment intact d'anticorps naturel connu capable de se lier à un antigène (Muyldermans et al 1994). En raison de leur petite taille, ils sont également nommés *Nanobodies*. Ils sont de plus en plus utilisés dans de nombreux domaines, en particulier dans le domaine de la Cancérologie et l'imagerie médicale.

On retrouve dans le sang des Camélidés trois isotypes d'IgG : les IgG<sub>1</sub> hétérotétramériques de type « conventionnel » et les IgG<sub>2</sub> et IgG<sub>3</sub> qui sont des homodimères de chaînes lourdes (*HcAbs*). La taille de l'*HcAb* est d'environ 90 KDa car ne présente pas de domaine constant C<sub>H1</sub> et de chaînes légères. L'absence du domaine constant C<sub>H1</sub> expliquerait pourquoi ces anticorps n'arrivent pas à associer de chaînes légères durant leur synthèse. Par conséquent, l'*HcAb* présente un unique domaine variable : le V<sub>H</sub>H.

Le V<sub>H</sub>H est codé par un gène unique d'environ 360 pb (Muyldermans et al 2013). Le V<sub>H</sub>H présente une surface remodelée directement relié aux domaines constants par une région charnière plus flexible, d'une longueur de 15 à 35 acides aminés ou de 12 acides aminés, définissant ainsi l'appartenance à l'isotype IgG<sub>2</sub> ou IgG<sub>3</sub> respectivement (Vincke & Muyldermans 2012) (voir Figure 5A). Son organisation génétique, similaire au V<sub>H</sub> des IgG classiques, comporte également quatre régions FR conservées encadrant trois régions hypervariables correspondant aux régions complémentaires déterminantes avec l'épitope (CDRs). Le V<sub>H</sub>H fait une taille de 110 acides aminés environ. Sa structure tridimensionnelle est organisée par deux ensembles agencés de quatre et cinq feuillettes beta antiparallèles où sont imbriquées les régions hypervariables en forme de boucles. Ces boucles, au nombre de trois, sont orientées en position N-terminale du domaine et forment ainsi une surface continue correspondant au paratope c'est à dire la zone de reconnaissance à l'épitope (voir Figure 5B).



**Figure 5. Comparaison entre une IgG conventionnelle et un *HcAb* de Camélidés.**

(A) Les immunoglobulines de type IgG sont composées de deux chaînes lourdes et deux chaînes légères (indiquées en violet). Au niveau N-terminal se trouvent les chaînes légères qui associées avec les régions variables des chaînes lourdes constituent la zone de reconnaissance de l'antigène. Les homodimères de chaînes lourdes (ou *HcAb*) comprennent deux domaines constants (CH2 et CH3) et un domaine variable (indiqué en rouge). Ce domaine variable unique représentant la zone de reconnaissance avec l'antigène est également nommé V<sub>H</sub>H ou *nanobody*. (B) La zone de reconnaissance de l'antigène du V<sub>H</sub>H est organisée comme la région V<sub>H</sub> d'une immunoglobuline conventionnelle avec la présence de 4 régions conservées FR encadrant 3 régions hypervariables CDR agencées en position N-terminale de l'anticorps dans sa structure tridimensionnelle. Isabel Van Audenhove & Jan Gettemans. EBioMedicine 2016.

Comparativement aux  $V_H$  conventionnelles, on peut noter des différences significatives. Les domaines CDR1 et CDR3 sont plus longs et permettent ainsi le maintien d'une surface « satisfaisante » du paratope. De plus, le domaine CDR1 possède deux points supplémentaires d'hypermutation somatique et expliquerait ainsi la compensation de limitation du répertoire par rapport aux immunoglobulines classiques pour lesquelles la diversité du paratope est en grande partie due à la combinaison d'un  $V_L$  et d'un  $V_H$  (Muyldermans et al 2009). Par ailleurs, leur conformation tertiaire plus étendue de forme convexe permettrait d'atteindre des cavités antigéniques concaves tels que le site actif d'une enzyme ou la zone d'un récepteur à son ligand (Lauwereys et al 1998 ; De Genst et al 2006 ; Muyldermans et al 2009). La région hautement conservée FR2 est constituée principalement d'acides aminés de nature hydrophobe pour les anticorps conventionnels. Dans le cas des  $V_{HH}$ , nous trouvons des acides aminés de nature hydrophiles et/ou de petites tailles, ce qui expliquerait leur solubilité élevée et éviterait leur agrégation en l'absence de chaîne légère (Muyldermans et al 2009).

#### 1.3.5.1. Les propriétés biologiques et physico-chimiques des $V_{HH}$

Les  $V_{HH}$  sont peu immunogènes car leurs séquences présentent de fortes homologies avec les gènes  $V_H$  de la famille 3 de l'Homme font qu'ils sont peu immunogènes (Bannas et al 2017). Leur structure monomérique simplifie leur clonage. De petite taille et de nature hydrophile (en particulier le domaine FR2), le  $V_{HH}$  peut être produit dans différents systèmes d'expression car conserve ses propriétés de reconnaissance de l'antigène malgré l'absence de formation de pont disulfure lorsqu'il est produit sous sa forme recombinante dans un système d'expression bactérien de type cytoplasmique (De Meyer et al 2014 ; Tanaka et al 2003 ; Li et al 2012).

Il a été montré que le  $V_{HH}$  possède des propriétés d'affinité et de spécificité élevée dans la reconnaissance de l'antigène (Hamers-Casterman et al 1993). Le domaine CDR3 du  $V_{HH}$ , représentant entre 60 à 80% de la surface de reconnaissance avec l'épitope, peut être exprimé sous forme d'une longue boucle permettant l'accès à des épitopes cryptiques, concaves ou masqués, non accessibles aux anticorps conventionnels (De Genst et al 2006 ; Muyldermans et al 2009 ; Garza et al 2017). *In vivo*, grâce à leur petite taille et à leur solubilité élevée, ils présentent de bonnes capacités de diffusion et de pénétration dans les tissus (Van Bockstaele et al 2009). Il a été démontré que certains  $V_{HH}$  pouvaient se fixer sur des cibles extra ou intracellulaires au niveau du cerveau et de fait, avaient la capacité de traverser la barrière hémato-encéphalique *in vitro* et *in vivo* et ainsi se fixer sur des antigènes considérés jusque là comme « inaccessibles » (Abulrob et al 2005 ; Lafaye et al 2009 ; Li et al 2012 ; Nabuurs et al 2010 ; Caljon et al 2012 ; Li et al 2016).

Grâce à leurs propriétés physicochimiques particulières, le  $V_{HH}$  peut présenter une grande stabilité et une grande résistance à des conditions physicochimiques extrêmes (Muyldermans et al 2013). Il peut être facilement concentré par ultrafiltration et conservé dans des tampons phosphate ou Tris conventionnels pendant des mois à 4°C ou plus longtemps à -20°C (Muyldermans et al 2013). Certains  $V_{HH}$  ont montré des résistances exceptionnelles à des températures allant jusqu'à 90°C, à des conditions de pH extrême ainsi qu'aux protéases (Van

der Linden et al 1999 ; Landenson et al 2006). L'exemple de V<sub>H</sub>H sélectionnés et dirigés contre une uréase d'*Helicobacter pylori* (bactérie impliquée dans l'ulcère de l'estomac) ont démontré une activité inhibitrice de la bactérie en présence d'acide chlorhydrique et de l'enzyme digestive pepsine (Ardekani et al 2013). D'autres études ont démontré la résistance des V<sub>H</sub>H aux agents dénaturants et aux solvants tels que le méthanol, l'acétone ou encore l'acétonitrile (Dona et al 2010 ; He et al 2014).

#### 1.3.5.2. L'obtention de V<sub>H</sub>H recombinants

Leur production nécessite en général l'immunisation d'un Camelidae avec l'antigène d'intérêt afin de pouvoir cloner l'ensemble du répertoire du segment génique V obtenu après purification des lymphocytes B sanguins périphériques. La région du gène correspondant au V<sub>H</sub>H a une taille d'environ 360 pb (soit 120 acides aminés) et peut être ainsi facilement obtenue par PCR. En pratique, 50 mL de sang périphérique d'un animal immunisé correspondant à 10<sup>6</sup> clones suffisent pour obtenir l'unique exon mûré du V<sub>H</sub>H recherché. Le principal inconvénient est de devoir créer une banque pour chaque antigène.

Il est également possible de travailler à partir d'une banque naïve. Cette stratégie peut être utilisée pour obtenir différents V<sub>H</sub>H dirigés contre différents antigènes, ou lorsque l'antigène est peu ou pas immunogène. C'est le cas par exemple des haptènes. Pourtant, l'absence de chaîne légère dans le V<sub>H</sub>H (les haptènes sont reconnus à l'interface V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> des anticorps conventionnels) peut être un désavantage (Wang et al 2016 ; Gonzales-Sapienza et al 2017). Travailler à partir d'une banque naïve nécessite l'obtention de mille fois plus de clones. En pratique, cela correspond à travailler à partir de un litre de sang périphérique (Sabir et al 2014 ; Wang et al 2016). Une autre alternative possible est d'utiliser une banque synthétique ou semi-synthétique. L'objectif reste le même que pour l'utilisation d'une banque naïve, c'est à dire conserver l'intégrité structurale du V<sub>H</sub>H tout en diversifiant de façon aléatoire les séquences correspondant aux CDR et particulièrement la région codant pour le CDR3. Cela nécessite l'utilisation d'amorces PCR dégénérées pour introduire des variations de séquence. Quelle que soit la banque utilisée pour obtenir les V<sub>H</sub>H d'intérêt, les stratégies pour le criblage de la banque et pour la production restent les mêmes.

Dans le cas d'une banque immune, l'immunisation par une injection initiale suivi de plusieurs injections de rappel va stimuler et enrichir le répertoire du système immunitaire de l'animal en anticorps spécifiques correspondant à plusieurs séquences codantes d'affinités variées. Bien évidemment, la qualité immunogénique de l'antigène est importante pour l'obtention de futurs V<sub>H</sub>H de bonnes affinités. Après l'immunisation d'un Camélidé, le prélèvement de 50 mL de sang périphérique contient théoriquement suffisamment de lymphocytes B, c'est à dire de *HcAbs* exprimés de haute affinité contre l'antigène d'intérêt pour constituer la banque. Après purification des lymphocytes B, les ADN complémentaires (ADNc) peuvent être synthétisés par rétrotranscription à partir des ARN messagers (ARNm) totaux. Une première PCR utilisant des amorces communes à tous les isotypes des IgG permet d'amplifier la région située entre les V<sub>H</sub> (des IgG<sub>1</sub>) ou les V<sub>H</sub>H (des IgG<sub>2</sub> et IgG<sub>3</sub>) et la région constante conservée CH2. Les amplicons correspondant aux séquences V<sub>H</sub>H, de tailles plus petites car ne

possèdent pas la région CH1, sont séparés après migration et purification sur gel d'agarose. Une deuxième PCR est ensuite réalisée sur ces amplicons purifiés avec des amorces spécifiques de la région V<sub>H</sub>H.

Le vecteur de clonage le plus utilisé pour constituer une banque de V<sub>H</sub>H est le phagémide car il présente les avantages de pouvoir être exprimé par le phage et par la bactérie. L'obtention d'une banque de V<sub>H</sub>H représentant la diversité du répertoire des *HcAbs* est réalisée par l'insertion des amplicons dans le phagémide. La sélection des V<sub>H</sub>H d'intérêt est réalisée par la technique de *Phage Display* (Smith GP 1985). Dans le phagémide, les séquences V<sub>H</sub>H sont insérées en phase avec le gène gIII du phage codant pour une des protéines de la capside. Des bactéries sensibles à l'infection par les bactériophages tel que le bactériophage filamenteux M13 sont transformées avec ces phagémides. Ces derniers sont auto-répliquatifs chez *E. coli*. Par contre, ils sont dépourvus des gènes leur permettant la formation de particules virales. La co-infection est alors réalisée avec le phage helper M13, permettant d'apporter les gènes supplémentaires nécessaires à la formation de virions. Ces derniers vont ainsi exprimer au niveau de leur capside la protéine de fusion V<sub>H</sub>H-gIII et être sécrétés dans le milieu de culture suite à un processus infectieux non lytique. Lors du clonage, un codon stop ambre (TGA) situé en aval de la séquence V<sub>H</sub>H insérée et en amont du gène gIII permet l'expression de la séquence V<sub>H</sub>H seule dans une souche bactérienne non suppressive du codon stop ambre. Dans une souche suppressive, l'expression de la séquence V<sub>H</sub>H sera fusionnée à la protéine gIII. Ainsi, des souches suppressives peuvent être utilisées pour la sélection des V<sub>H</sub>H et des souches non suppressives pour la production des V<sub>H</sub>H.

Le criblage des phages exprimant à leur surface les séquences V<sub>H</sub>H d'intérêt se fait généralement par plusieurs cycles d'enrichissement par affinité appelés *biopanning*. Les phages produits, suite à la co-infection avec le phage helper, sont sélectionnés vis à vis de leur affinité à reconnaître l'antigène. Cette sélection peut être réalisée sur un support solide présentant l'antigène fixé. Les phages ainsi sélectionnés sont amplifiés à partir d'un nouveau cycle d'infection sur une nouvelle culture bactérienne. Pour chaque cycle, un agent saturant différent est utilisé. Généralement, l'obtention de V<sub>H</sub>H très affins pour l'antigène sont obtenus au bout de trois cycles.

#### 1.3.5.3. Exemples de V<sub>H</sub>H utilisés en tant que traceurs *in vivo* par imagerie médicale

Les V<sub>H</sub>H sont de plus en plus utilisés en préclinique en tant que traceur *in vivo* par imagerie médicale, notamment pour la détection rapide de cellules tumorales où ils ont démontré de meilleures performances que les anticorps monoclonaux (Hu et al 2015).

En oncologie, l'hyper-expression de certains récepteurs membranaires a été validée pour être des marqueurs de cellules tumorales. C'est le cas notamment pour les récepteurs des facteurs de croissances épidermiques : l'*Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)* et le *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER-2)* où une hyper-expression a été montrée dans 15 à 30% des cancers du sein et 10 à 30% des cancers des voies digestives supérieures (Iqbal et al 2014). Actuellement, le traitement par immunothérapie de ces types de cancers utilise les

anticorps monoclonaux Cetuximab, dirigés contre l'*EGFR* et Trastuzumab, dirigés contre l'*HER-2* (Harding J et al 2005 ; Nami B et al 2018).

Plusieurs études précliniques *in vivo*, sur des modèles de xénogreffes de tumeurs chez la souris, ont comparés les capacités de détection des cellules tumorales par des  $V_{HH}$  dirigés contre l'*EGFR* ou l'*HER-2* avec leurs équivalents monoclonaux (Cetuximab et Trastuzumab) par des techniques d'imagerie médicale : la tomographie par émission monophotonique (TEMP), la tomographie par émission de positrons (TEP) et l'imagerie optique.

Des  $V_{HH}$  anti-*EGFR*, fusionnés aux radioéléments  $^{99m}Tc$  ou  $^{68}Ga$ , ont permis de générer des clichés avec un bon ratio tumeur / tissu sain entre 45 minutes et 1 heure post-injection, sur les xénogreffes *in vivo*, aussi bien par TEMP que par TEP. Des clichés similaires ont été obtenus avec le  $^{99m}Tc$  Cetuximab 24 heures post-injection (Vosjan et al 2011 ; Kruwel et al 2016). Une autre étude a comparé l'accumulation d'un  $V_{HH}$  anti-*HER2* avec l'anticorps monoclonal Trastuzumab, marqués avec l'IRDye 800CW, au niveau de xénogreffes de tumeurs du sein par imagerie optique. Entre 1h à 4h post-injection, le  $V_{HH}$  anti-*HER2*-IRDye 800CW a permis de délimiter la tumeur avec un très bon ratio tumeur / tissu sain alors que des images similaires ont seulement été obtenues 72h post-injection avec le Trastuzumab-IRDye 800CW. Plusieurs organes ont été analysés *ex vivo* à 4h ou à 72h post-injection pour le  $V_{HH}$  et pour le Trastuzumab respectivement. Les résultats ont montré une accumulation de signal fluorescent uniquement au niveau des reins pour les souris injectées avec le  $V_{HH}$  anti-*HER2*-IRDye800CW alors que des signaux fluorescents étaient encore émis dans le sang et dans des organes très vascularisés tels que les poumons et la rate, ainsi qu'une accumulation particulière d'émission de signal au niveau du Foie pour les souris injectées avec le Trastuzumab-IRDye 800CW (Kijanka et al 2013).

Ces résultats ont montré que les  $V_{HH}$  étaient capables *in vivo* de détecter spécifiquement en quelque(s) heure(s) des antigènes tumoraux dans les tissus. Les  $V_{HH}$  « non fixés » sont rapidement éliminés de la circulation sanguine et permettent ainsi l'obtention de clichés ou d'images de bonne qualité (ratio tumeur / tissu sain) pour l'interprétation. Cette caractéristique présente aussi l'avantage de pouvoir utiliser des radioéléments à demi-vies courtes (ex : 68 min pour le  $^{68}Ga$ ) qui permet de diminuer le temps d'exposition du patient aux rayons ionisants. Par contre, les anticorps monoclonaux ne semblent pas être de bons candidats pour des études à court terme car ils possèdent une demie-vie longue (2 à 4 jours) et un taux de diffusion lent dans les tissus.

D'autres études ont conforté le potentiel des  $V_{HH}$  en tant que traceur *in vivo* pour la détection d'autres marqueurs tumoraux (cancer de la prostate, cancer du colon) et des marqueurs de l'inflammation intervenant dans les phénomènes d'athérosclérose et d'arthrite rhumatoïde (Chatalic et al 2015 ; Cortez-Retamozo et al 2008 ; Bala et al 2012 ; Rashidian et al 2015).

#### I.4. HYPOTHESES DE TRAVAIL

Les besoins d'amélioration diagnostique et pronostique, ainsi que la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques pour cette maladie négligée sont toujours d'actualité. Au cours de son évolution, *T. cruzi* a mis en place de multiples stratégies pour déjouer le système immunitaire de l'hôte et ainsi persister chez ce dernier afin de maintenir son cycle biologique. La principale difficulté pour lutter contre ce parasite est sa capacité à se maintenir dans les tissus de l'hôte, « à l'abri » du système immunitaire durant la phase chronique de la Maladie. A cela s'ajoute la difficulté de prise en charge précoce des personnes infectées vivant majoritairement dans les zones rurales et pauvres des zones endémiques liée au manque de symptômes caractéristiques de l'infection, au faible moyen des centres de santé présents dans ces zones et au manque de sensibilité et de spécificité des tests diagnostics existants. Aujourd'hui, la problématique concerne également de nombreux pays hors des zones d'endémie où des personnes infectées viennent s'installer et généralement ne sont pas diagnostiquées et donc ne sont pas médicalement suivies. Par ailleurs, les deux seules molécules trypanocides utilisées contre *T. cruzi* : le benznidazole et le nifurtimox ont seulement prouvé une réelle efficacité durant la phase aiguë (Viotti et al 2006). De plus, certains malades ne répondent pas aux traitements ou encore il est difficile d'évaluer l'efficacité post-traitement. Ce constat conforte donc la nécessité de développer de nouveaux tests diagnostics et des traitements plus efficaces.

Une des stratégies utilisée par *Trypanosoma cruzi* pour échapper au système immunitaire de l'hôte de façon précoce et persistante est sa capacité à sécréter/excréter des mitogènes et des superantigènes (Minoprio et al 1989 ; Reina-San-Martin et al 2000 ; Bermejo et al 2011). Ces molécules parasitaires provoquent une activation polyclonale des lymphocytes B et T dont la maturation terminale est caractérisée par une forte non spécificité de la réponse. En plus du bénéfice évident d'échappement pour le parasite et ainsi pouvoir infecter ses cellules cibles, la haute perturbation du système immunitaire concomitante à l'infection peut également à elle seule entraîner les complications sévères de la Maladie plusieurs années après la primo-infection, notamment par des mécanismes d'auto-immunité (Teixeira et al 2011). La *Trypanosoma cruzi* proline racemase fait partie de ces mitogènes pour les cellules B, sécrétée/excrétée par le parasite au cours de l'infection. C'est également une enzyme essentielle pour la survie et la virulence du parasite (Chamond et al 2005). De plus, il a été démontré récemment que les gènes de la *TcPRAC* sont présents dans tous les génotypes du parasite et sont absents chez l'Homme et chez les autres trypanosomatidés pathogènes pour ce dernier (Caballero et al 2015).

Au delà de la Maladie de Chagas, la communauté scientifique s'est engagée sur la recherche de marqueurs spécifiques du pathogène plutôt que ceux correspondant à la réponse immunitaire de l'hôte. Les avantages sont certains concernant le potentiel de ces marqueurs dans l'élaboration de nouveaux tests diagnostiques et de tests permettant le criblage de molécules potentielles pour l'élaboration de nouvelle(s) chimiothérapie(s) qui manquent encore pour de nombreuses maladies infectieuses. D'après la définition de l'OMS, la découverte de nouveaux « biomarqueurs », c'est à dire « toute substance, structure ou

processus pouvant être mesuré dans le corps permettant de prédire l'incidence ou l'issue d'une pathologie » est un défi évident pour continuer à faire progresser la Médecine.

Quelques questions simples peuvent être formulées notamment sur les techniques disponibles pour le diagnostic et le pronostic de la Maladie de Chagas :

- i. Les méthodes disponibles dans les banques de sang et les centres de santé pour les patients infectés, ou encore pour les infections congénitales sont-elles satisfaisantes ?
- ii. Les méthodes utilisées pour le pronostic et le suivi post-traitement de la maladie sont-elles satisfaisantes ?
- iii. La sensibilité et la précision de ces tests sont-elles adéquates ?

Nous ne pouvons pas répondre par l'affirmative à ces questions. Dans ce contexte, nous avons voulu valider ou infirmer si la *TcPRAC* pourrait être un marqueur parasitaire *stricto sensu*, pertinent et spécifique de l'infection et de la Maladie de Chagas. Pendant mon projet doctoral, je me suis engagé à répondre particulièrement à 2 hypothèses principales :

1. La *TcPRAC* peut-elle être un marqueur diagnostique et de suivi spécifique de l'infection à *T. cruzi* ?
2. Pouvons nous, par le biais de ce marqueur, développer un prototype permettant la détection du parasite intratissulaire *in vivo* ?

Pour répondre à ces hypothèses, nous avons développé des outils biologiques et moléculaires grâce à la génération de différents anticorps dirigés contre la *TcPRAC* et des amorces spécifiques des gènes *TcPRAC*. Nous avons utilisé le modèle expérimental murin, bien défini au laboratoire, qui nous a permis d'obtenir et de tester des échantillons biologiques par des méthodologies *in vitro*. Nous avons généré des parasites exprimant de façon constitutive le gène de la *Firefly luciferase* et des gènes tels que la GFP et l'E2-Crimson qui nous ont permis de suivre *in vivo* et en temps réel l'infection grâce à l'imagerie. Les résultats de ces travaux ont permis l'écriture d'un article scientifique soumis à publication dans le journal PLoS Neglected Tropical Diseases : *Specific serological and molecular tools for diagnosis of experimental Chagas infection and disease : towards a reliable test for diagnosis and monitoring of treatment efficacy* (Article n°1).

Mon implication dans les précédents travaux du laboratoire, notamment ceux démontrant que la *TcPRAC* est impliquée dans la virulence du parasite et ceux décrivant le mécanisme catalytique de l'enzyme (Chamond et al 2005 ; Buschiazzo, Goytia et al 2006), m'ont permis de travailler sur l'optimisation de nouveaux inhibiteurs afin de répondre à une question supplémentaire : la *TcPRAC* est-elle une cible pour le développement de nouvelles chimiothérapies ? et d'être co-auteur d'un article publié dans le journal PLoS Neglected Tropical Diseases : *Designed mono and di-covalent inhibitors trap modeled functional motions for Trypanosoma cruzi proline racemase* » (Article n° 2).

## **II. MATERIELS & METHODES**

## Préparation de la protéine recombinante TcPRAC

La proline racémase de *T. cruzi* recombinante a été produite chez la souche *E. coli* BL21 (DE3) et purifiée avec une colonne d'affinité IMAC (*Immobilized-Metal Affinity Chromatography*) comme décrit dans l'article Reina-San-Martin et al 2000.

## Production de sérums polyclonaux et d'anticorps monoclonaux anti-TcPRAC

Le sérum polyclonal de lapin anti-TcPRAC a été obtenu après l'immunisation d'un lapin âgé de 2 mois avec 100 µg de TcPRAC recombinante mélangée à l'adjuvant complet de Freund à J0. L'animal a ensuite été immunisé avec plusieurs injections de 200 µg de TcPRAC recombinante mélangée à l'adjuvant incomplet de Freund à 15 jours d'intervalle. Le sérum polyclonal d'alpaca a été obtenu après l'immunisation d'un jeune alpaca mâle avec 100 µg de TcPRAC recombinante mélangé à l'adjuvant complet de Freund à J0 puis avec 100 µg de TcPRAC recombinante mélangé à l'adjuvant incomplet de Freund à J21 et J35. Les anticorps monoclonaux de souris anti-TcPRAC, produits par les laboratoires bioMérieux, ont été obtenus après l'immunisation de souris Balb/c âgées de 5 semaines avec 10 µg de TcPRAC recombinante mélangée à l'adjuvant Ribi à J0, J14 et J28.

## Production des V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC

### i. Construction de la banque immune de V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC

Un alpaca (*Lama pacos*) mâle âgé de 2 ans a été immunisé avec 100µg de TcPRAC recombinante à J0, J21 et J35 (Reina San Martin et al 2000). La première immunisation a été réalisée avec l'adjuvant complet de Freund et les deux suivantes avec l'adjuvant incomplet. A J52, le sérum a été testé par ELISA contre la TcPRAC recombinante. La révélation du test a été réalisée avec un sérum de lapin polyclonal anti-alpaca (Boado et al 2013). Les ADNc ont été synthétisés par rétrotranscription à partir des ARNm totaux issus de la purification des lymphocytes B périphériques de l'animal immunisé (Lafaye et al 1995). A partir des ADNc, les fragments correspondant aux régions VH-CH2 ont été amplifiés et purifiés sur gel. Une deuxième PCR a été réalisée pour amplifier uniquement les fragments correspondant aux régions V<sub>H</sub>H en utilisant des amorces permettant l'ajout de sites de restrictions pour l'insertion dans le vecteur de clonage pHEN1 (Lafaye et al 1999). La construction de la banque immune a été obtenue après transformation de bactéries *E. coli* TG1 avec les phagémides pHEN1 recombinants (Li et al 2016).

### ii. Criblage et enrichissement de la banque immune par Phage display et biopanning

Les séquences V<sub>H</sub>H fusionnées avec la séquence de la protéine gIII dans les phagémides ont été exprimées à la surface des phages après induction et co-infection des bactéries par le phage *helper* M13 (Li et al 2016). Les phages exprimant les séquences V<sub>H</sub>H d'intérêt ont été sélectionnées vis à vis de l'antigène fixé sur un support solide (ELISA). L'enrichissement par *biopanning* des phages d'intérêt a été réalisé sur trois cycles (Li et al 2016).

### iii. Sélection des phages les plus affins vis à vis de l'antigène par ELISA

Une centaine de clones bactériens, chacun comportant un clone unique de  $V_{\text{HH}}$ , ont été induits et coinfectés afin de produire les phages exprimant à leur surface les  $V_{\text{HH}}$  anti-*TcPRAC*. Ces derniers ont été directement testés par ELISA indirect en utilisant la *TcPRAC* recombinante pour la capture du test. Les clones positifs ont ensuite été amplifiés par PCR puis séquencés. L'analyse des alignements de séquences correspondants aux clones positifs a permis la sélection de clones  $V_{\text{HH}}$  anti-*TcPRAC* présentant des séquences différentes particulièrement au niveau des régions CDR1 et CDR3. Ces clones produits et purifiés en plus grande quantité après coinfection par le phage M13. Les plus affins pour l'antigène d'intérêt ont été sélectionnés par ELISA indirect utilisant la *TcPRAC* recombinante pour la capture du test.

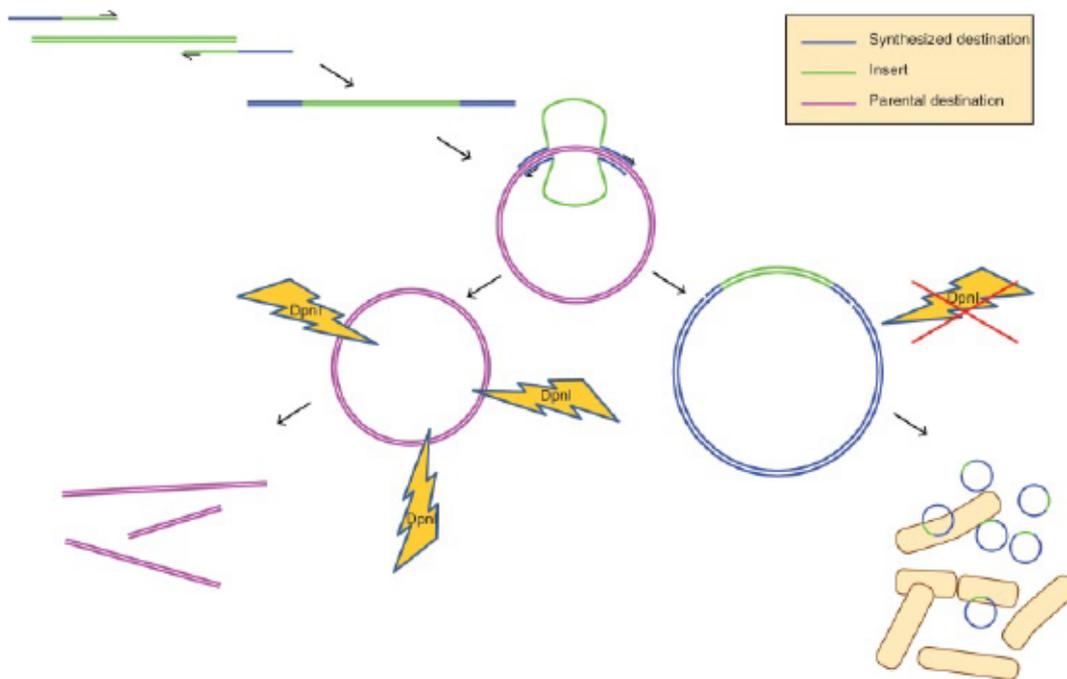
### iv. Sous-clonage, expression et purification des clones $V_{\text{HH}}$ anti-*TcPRAC* sélectionnés

Les séquences codantes des  $V_{\text{HH}}$  sélectionnés ont été sous-clonées dans le vecteur d'expression bactérien pET23d (Novagen). Ce vecteur permet l'addition d'une queue hexahistidine en C-terminale de la séquence insérée. Son expression est cytoplasmique (Li et al 2016). Pour le sous-clonage, nous avons utilisé la stratégie de *Restriction Free Cloning* (Van Den Ent & Lowe 2006). Cette technique est basée sur la synthèse par PCR d'une méga-amorce (*mega-primer*) obtenue grâce à une paire d'amorces hybrides permettant l'amplification des séquences d'intérêt encadrées par des séquences correspondant au vecteur de destination (voir Figure 6). Des bactéries DH5 $\alpha$  compétentes (Invitrogen) ont été transformées avec les plasmides d'intérêt et sélectionnées sur des boîtes de pétri contenant l'antibiotique de sélection (ampicilline). Plusieurs clones bactériens ont été vérifiés par séquençage grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques du plasmide pet23 encadrant la région d'insertion des séquences  $V_{\text{HH}}$ . Les préparations plasmidiques des constructions validées par séquençage ont été effectuées et ont été utilisées pour transformer des bactéries compétentes *E. coli* BL21 (DE3) Express Duo (Lucigen). L'expression cytoplasmique des  $V_{\text{HH}}$  anti-*TcPRAC* a été obtenue par induction des cultures bactériennes avec de l'IPTG (*Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*) à 0,5 mM final. Après cassage des culots bactériens à la presse de French à une pression de 1,4 kbar, la purification des extraits bactériens a été réalisée par chromatographie d'affinité (colonnes IMAC *immobilized-metal affinity chromatography*) suivi d'une chromatographie d'exclusion de taille (Li et al 2016).

### v. Marquage avec les fluorochromes Alexa 488 et IRDye 800 CW

Les  $V_{\text{HH}}$  anti-*TcPRAC* recombinants purifiés ont été testés par ELISA indirect sur l'antigène d'intérêt. La production des séquences synthétiques correspondantes a été réalisée en ajoutant (i) un codon correspondant à l'acide aminé cystéine à l'extrémité C-terminale des séquences  $V_{\text{HH}}$  pour ne pas interférer avec la zone de reconnaissance de l'épitope se trouvant en dans la région N-terminale (ii) les séquences des sites de restriction NotI et XhoI aux extrémités des peptides synthétiques pour le futur clonage dans le vecteur pET23d (Eurofins genomics, Allemagne). L'expression, la production et la purification des peptides synthétiques

correspondants aux V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC ont été réalisées comme décrit précédemment. La conjugaison au niveau de la cystéine en position C-terminale avec les fluorochromes Alexa 488-maléimide et IRDye 800 CW-maléimide (Li-Cor Corporate, USA) a été réalisée comme décrit dans les données supplémentaires de l'article de Li et al 2016.



**Figure 6 : Principe de clonage « sans l'utilisation de sites de restriction ».**

Des amorces hybrides sont dessinées afin d'être complémentaire avec la séquence à insérer (vert) et le plasmide de destination (bleu). Une 1<sup>ère</sup> PCR permet la formation d'une méga-amorce comprenant la séquence de l'insert encadrée par des séquences complémentaires au vecteur de destination. Durant la 2<sup>ème</sup> PCR, la méga-amorce initie la réplication du plasmide de destination (rose). Puisque le plasmide de destination est répliqué en entier durant la réaction, la méga-amorce se liant à une molécule fille ne parvient pas à exposer une extrémité 3' libre pour l'élongation par la polymérase, de sorte que l'amplification de nouveau produit est linéaire. Le plasmide de destination doit être purifié à partir d'une souche bactérienne DAM +, car l'enzyme DpnI est utilisé pour dégrader sélectivement l'ADN parental après la deuxième réaction de PCR, en laissant ainsi intacts les produits dérivés non méthylés. La réaction peut ainsi être utilisée pour transformer des bactéries compétentes.

Extrait de Nucleic Acids Research ; 2012 (40):209-2013.

### **Génération de parasites génétiquement modifiés exprimant le gène de la *Firefly luciferase* et le gène d'une molécule fluorescente *Green Fluorescent Protein (GFP)* ou *E2-Crimson***

Les séquences amplifiées par PCR des gènes de la GFP et de la molécule E2-Crimson ont été insérées, en aval et en phase du cadre de lecture avec le gène de la *Firefly luciferase* présent au niveau du site de clonage du vecteur pTREX-luci (Addgene), avec la stratégie de *Gibson assembly* (Li et Elledge 2007). Le plasmide pTREX-n permet une intégration stable dans le génome de *T. cruzi* (Vazquez & Levin 1999). Les deux constructions pTREX-luci-GFP et pTREX-luci-E2-Crimson, après transformation dans des bactéries compétentes DH5 $\alpha$ , ont été amplifiées par Miniprep plasmidique. Les séquences des vecteurs plasmidiques ont été

confirmées par séquençage (Eurofins Cochin, France). Les formes épimastigotes des souches polaires, CL Brener et Y, ont été transfectées avec les plasmides linéarisés par l'enzyme de restriction NheI, avec la technologie Amaxa™ Nucleofector™ II (Lonza, Allemagne). Les parasites transfectés ont été sélectionnés dans du milieu LIT (*Liver Infusion Tryptose medium*), contenant l'antibiotique de sélection G418, par la technique de dilution limite afin d'isoler les transfectants issus d'un clone unique. Les parasites qui expriment les gènes de la *Firefly luciferase* et de la GFP ou de la molécule E2-Crimson ont été nommés respectivement Luc-green et Luc-red.

### **Test de détection par immunofluorescence directe**

Des lames 8 puits LPX5 (Labo Moderne, France) ont été préalablement traitées avec de la poly-L-lysine à 0,01%.  $10^5$  épimastigotes provenant de cultures synchronisées et en phase exponentielle de croissance sont préalablement rincées plusieurs fois dans du PBS avant d'être déposés sur les puits. Les parasites sont séchés à l'air sous une hotte, puis fixés avec une solution de paraformaldéhyde à 4% en PBS et perméabilisés avec une solution de PBS contenant de la sérum albumine bovine (SAB) à 1% et du Triton X-100 à 0,2%. Les puits sont ensuite bloqués avec une solution de PBS contenant de l'SAB à 3%. Les différents anticorps anti-TcPRAC (les sérums polyclonaux de lapin et d'alpaca anti-TcPRAC et les sérums témoins naïfs de chaque espèce sont dilués au 1/300<sup>e</sup>; les anticorps monoclonaux anti-TcPRAC sont déposés à 10 µg/ml) puis les anticorps secondaires marqués à l'Alexa 488, dilués en PBS ASB 3%, sont déposés sur les puits correspondants. Les anticorps secondaires marqués à l'Alexa 488 sont utilisés aux concentrations suivantes : IgG de chèvre anti-lapin Alexa 488 à 2µg/ml ; anticorps de lapin anti-Ig totales d'alpaca à 10µg/ml ; anticorps de chèvre anti-IgG de souris au 1/1000<sup>e</sup>). Une solution de DAPI à 1µg/ml est utilisée pour marquer les noyaux des parasites. Après séchage, le montage entre lame et lamelle est effectué avec une solution de montage *SlowFade Diamond Antifade Mounting* (Life Technologies, France). Tous les lavages, entre les différentes incubations, ont été effectués en PBS Tween 20 à 0,2%. Les acquisitions des signaux de fluorescence ont été réalisées sur un microscope à fluorescence Olympus FV1000 MPE.

### **Infections et traitements des souris**

Des souris Swiss et Balb/c mâles âgées entre 5 et 6 semaines ont été infectées par voie intrapéritonéale avec  $10^4$  ou  $10^3$  trypanomastigotes du sang des souches CL-Luc-Green, CL-Luc-Red, Y-Luc-Green ou Y-Luc-Red. Une infection avec  $10^3$  parasites permet de diminuer la mortalité des souris pendant la phase aiguë et d'augmenter le nombre de souris qui vont passer en phase chronique. Les souris ont été traitées par voie orale pendant 10 jours avec une dose quotidienne de benznidazole (Rochagan, Roche) à 100 mg/kg dilué en PBS-DMSO 5%.

### **Préparation des sérums et des ADN totaux à partir du sang périphérique**

Entre 100 µl à 200 µl de sang périphérique ont été prélevés sur des groupes de souris infectées à différents jours post-infection. Les sérums ont été obtenus après la formation du

caillaux sanguin à 4°C et une centrifugation à 2500 rpm pendant 5 minutes pour séparer les sérums des globules rouges. Les ADN totaux du sang périphérique ont été extraits directement après prélèvement ou après conservation à -20°C avec le kit d'extraction Qiagen QIAamp DNA Mini and Blood Mini en suivant les instructions du manuel.

#### **Test ELISA indirect pour la détection des anticorps anti-*TcPRAC* sériques**

10ug/ml de *TcPRAC* recombinante dilué en PBS ont été adsorbés dans des plaques Maxisorb 96 puits (Nunc) pendant 16h à 4°C. La saturation des puits a été effectuée en PBS contenant 1% de sérum albumine bovine (SAB) pendant 1h à température ambiante. Les sérums murins sont ensuite dilués au 1/50<sup>e</sup> puis de 1/2 en 1/2 par dilutions sériées en PBS-SAB 1% puis incubés pendant 1h à température ambiante. La révélation des tests a été effectuée, après l'incubation d'anticorps de chèvre anti-IgG de souris marqués à l'*Horseradish peroxidase* (HRP) pendant 1h à température ambiante, avec le substrat TMB. La lecture des densités optiques (D.O) à la longueur d'onde de 450nm a été réalisée avec un spectrophotomètre.

#### **Test ELISA sandwich (direct et indirect) pour la détection de la *TcPRAC* circulante sérique**

Pour la capture, les sérums polyclonaux de lapin et d'alpaca anti-*TcPRAC* et les anticorps monoclonaux de souris anti-*TcPRAC* ont été dilués au 1/3000<sup>e</sup> et au 1/7000<sup>e</sup> respectivement en PBS et adsorbés dans des plaques Maxisorb 96 puits (Nunc) pendant 16h à 4°C. La saturation des puits a été effectuée en PBS – BSA 1% pendant 1h à température ambiante. Les sérums murins sont ensuite dilués au 1/10<sup>e</sup> puis de 1/2 en 1/2 par dilutions sériées en PBS-SAB 1% puis incubés pendant 2h à température ambiante. La révélation des tests avec le substrat TMB a été effectuée (i) soit directement après l'incubation d'un anticorps monoclonal anti-*TcPRAC* de souris marqués à l'HRP utilisé au 1/3000<sup>e</sup> ou (ii) soit après l'utilisation d'un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris marqué à l'HRP utilisé au 1/6000<sup>e</sup>, pendant 1h à température ambiante. La lecture des densités optiques (D.O) à la longueur d'onde de 450nm a été réalisée avec un spectrophotomètre.

#### **PCR quantitative TaqMan pour la détection des gènes *TcPRAC***

Les amorces et la sonde ont été dessinées avec le logiciel Primer3Plus (Whitehead Institute) afin d'amplifier spécifiquement une région de la séquence des gènes *TcPRAC* d'une taille de 194 pb : amorce sens 5'-GGAAGGGATGCTCGTTGTAA-3' ; amorce anti-sens 5'-TACGTAGCAGCACCTGTTCG-3' ; sonde marquée en 5' avec le fluorochrome 6-carboxyfluorescéine et fusionnée en 3' avec le *quencher* BHQ1 5'-CCACACCATGCTGTTTGACC-3' (Eurofins genomics). Les réactions PCR ont été réalisées dans des plaques 96 puits MicroAmp optical (Thermofisher) sur 100 ng d'ADN total dans le tampon réactionnel Universal TaqMan Master Mix contenant 0,5 µM des amorces sens et anti-sens et 250 nm de la sonde pour un volume final de 20 µl. Après 10 minutes à 50°C afin d'activer la *hot-start DNA polymerase*, 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C ont été réalisés sur le système de PCR en temps réel QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). Pour

chaque échantillon, les réactions d'amplification ont été effectuées en *triplicate*. Une courbe standard permettant la quantification des échantillons exprimée en parasites/ml a été obtenue à partir d'une gamme standard de quantité connue d'ADN issue de l'infection artificielle de sang de souris naïve par les formes épimastigotes CL et Y du parasite. Les analyses des données ont été effectuées avec le logiciel QuantStudio v1.3 (Applied Biosystems).

#### **Acquisitions *in vitro* des signaux de fluorescence par imagerie**

Les parasites génétiquement modifiés, exprimant soit la GFP soit l'E2-Crimson, ont été visualisés avec une station d'image FLoid™ Imaging Station (Molecular Probes Life Technology, France) qui permet l'acquisition d'images de haute résolution en contraste de phase et en épifluorescence dans 3 canaux de fluorescence : vert (GFP, Alexa 488...), bleu (DAPI) et rouge (E2-Crimson, TexasRed...) grâce à un système d'illumination LED, une caméra et des optiques de haute qualité.

#### **Acquisitions *in vivo* des signaux de bioluminescence et de fluorescence par imagerie**

Avant chaque acquisition, les souris ont été anesthésiées avec un mélange de xylazine à 15mg/kg (Rompun, Bayer Lab) et de kétamine à 100mg/kg (Imalgène, Merial Lab) dilué en PBS. Pour les acquisitions des signaux de bioluminescence, les souris sont préalablement injectées avec de la d-luciférine à 150mg/kg (Perkin Elmer). Les captures de signaux de bioluminescence et de fluorescence (en épi- ou en trans-illumination) ont été réalisées avec le système d'imagerie optique IVIS® Spectrum™ (Caliper Life Sciences) comportant une caméra optique de haute sensibilité capable de capter un large spectre de signaux fluorescents jusqu'à l'infra-rouge lointain. La visualisation et la quantification des régions d'intérêt (ROI) des signaux de bioluminescence exprimés en photons/sec et des signaux de fluorescence exprimés en (photons/sec/cm<sup>2</sup>/surface)/(μW/cm<sup>2</sup>) ont été réalisées avec le logiciel Living Image 4.0 (Caliper Life Sciences).

### **III. RESULTATS**

### III.1. La *TcPRAC* et les anticorps anti-*TcPRAC* peuvent être détectés dans la circulation périphérique de souris infectées par *T. cruzi*

Comme nous l'avons présenté, les formes trypomastigotes infectantes de *Trypanosoma cruzi* sécrètent/excrètent au cours de l'infection aiguë et chronique, une enzyme/mitogène spécifique du parasite : la *TcPRAC*. Ainsi, il serait possible de démontrer la présence du parasite grâce à la détection de cette molécule sous sa forme circulante, membranaire ou cytoplasmique, ou encore par la détection d'anticorps spécifiquement dirigés contre la molécule. Cependant, il est important de noter que cette hypothèse est conditionnée par le fait que le nombre de parasites circulants est très variable selon le stade de la maladie. Lors de la phase aiguë, la parasitémie est significative, tandis que pendant la phase chronique de l'infection le nombre de parasites qui circule est très faible, voire nul. Cette difficulté pourrait être dépassée par l'amplification des gènes *TcPRAC*. Nous pourrions ainsi mettre en évidence de façon spécifique la présence du parasite dans la circulation.

Pour répondre à la première hypothèse de notre travail et d'attribuer à la *TcPRAC* un rôle de biomarqueur pour l'infection à *T. cruzi*, nous avons :

- i. Produit différents anticorps dirigés contre la *TcPRAC* ;
- ii. Synthétisé des paires d'amorces spécifiques pour l'amplification des gènes *TcPRAC* ;
- iii. Généré à partir de deux souches polaires de *T. cruzi* (CL Brener et Y) des parasites génétiquement modifiés capables d'exprimer constitutivement le gène de la *Firefly luciferase*, le gène de la GFP ou de l'E2-Crimson ;
- iv. Mis au point des tests sérologiques indirects pour détecter et quantifier la *TcPRAC* circulante sérique ainsi que les immunoglobulines de type IgG anti-*TcPRAC* ;
- v. Mis au point des tests directs pour détecter le parasite soit par PCR soit par un test d'immunofluorescence.

Nous avons d'abord validé la reconnaissance de la *TcPRAC* par les différents anticorps par la technique de Western blot. Différentes combinaisons d'anticorps anti-*TcPRAC* ont été utilisées pour mettre au point des tests ELISA. La spécificité de ces tests a été validée à partir de sérums murins infectés par *T. cruzi*, *L. donovani* et *T. vivax*, des trypanosomatidés infectieux pour l'Homme et pour les animaux.

Pour la détection et la quantification de la *TcPRAC* circulante dans les sérums de souris infectées par *T. cruzi*, les deux combinaisons qui nous ont donné les meilleures performances ont été celles ayant utilisé le sérum polyclonal anti-*TcPRAC* de lapin ou d'alpaca pour la capture et un anticorps monoclonal anti-*TcPRAC* de souris, marqué à la *Horseradish Peroxidase* (HRP) ou bien révélé par un anticorps secondaire : un anti-IgG de souris marqué HRP pour la révélation. Grâce à une courbe standard utilisant des dilutions sériées de *TcPRAC* recombinante, les limites de détection de ces ELISA sandwich ont été estimées, entre 12 et 46 ng/ml, lorsque les sérums polyclonaux anti-*TcPRAC* d'alpaca ou de lapin sont utilisés pour la capture, respectivement et à 1 ng/ml lorsque l'anticorps monoclonal de souris (#5C9D7) est utilisé pour la capture. Avec ce test, il nous a été possible de détecter et de

quantifier de façon spécifique les taux de *TcPRAC* circulants dans des sérums « aigus » et « chroniques » de souris infectées par les souches CL Brener et Y du parasite de J15 à J120 post-infection, à des taux allant de 100 ng/ml à plusieurs µg/ml.

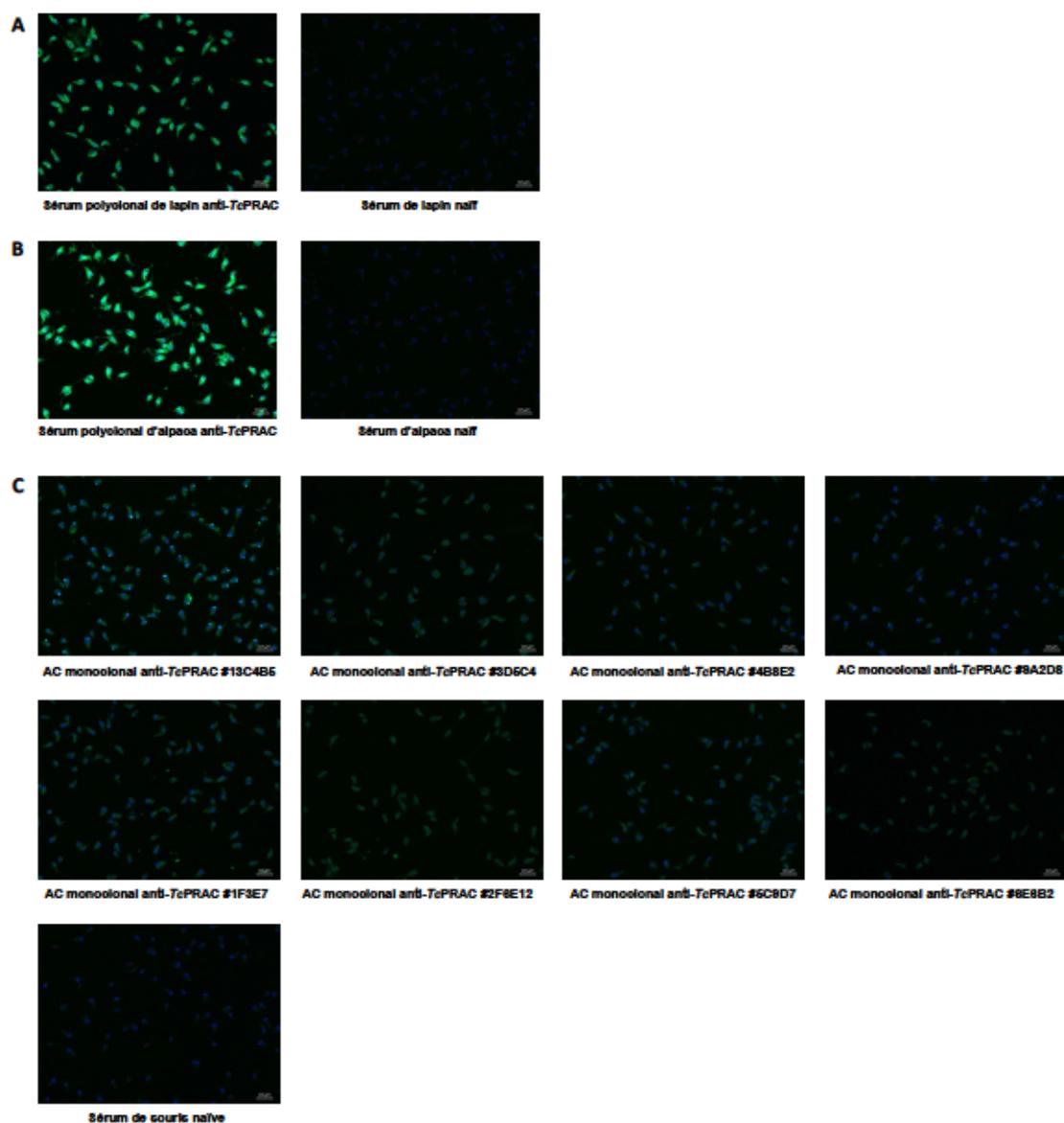
Un test ELISA indirect, utilisant la *TcPRAC* recombinante comme antigène de capture, nous a permis de détecter et de quantifier les taux d'IgG sériques dirigées contre la *TcPRAC* dans des sérums « aigus » et « chroniques » de souris infectées à des taux de l'ordre du ng/mL avec un fenêtre de détection allant de J20 à au moins J100 post-infection.

De façon intéressante, durant la phase chronique, bien que les parasites soient très peu détectables dans la circulation, les tests ELISA ont été suffisamment sensibles pour détecter la *TcPRAC* circulante dans les sérums « chroniques ». Ces résultats sont compatibles avec notre hypothèse que la détection de la *TcPRAC* circulante est corrélée avec la présence de parasites vivants.

De manière à confirmer ces données, nous avons testé la possibilité d'amplifier les gènes *TcPRAC* à partir d'ADN totaux issus du sang de souris infectées. Dans un premier temps, nous avons validé la spécificité des amorces utilisées pour l'amplification des gènes *TcPRAC* par PCR conventionnelle sur des ADN génomiques de différents trypanosomatidés : *T. cruzi*, *T. vivax*, *L. donovani* et *T. brucei*. Dans un deuxième temps, pour quantifier la charge parasitaire, nous avons comparé deux techniques de PCR en temps réel : SYBR Green et TaqMan. Une haute spécificité et une meilleure sensibilité de l'ordre de 10 parasites/mL ont été obtenues en utilisant la technologie TaqMan avec une des cinq paires d'amorces synthétisées. Cette méthodologie nous a permis d'amplifier de façon spécifique les gènes *TcPRAC* sur des échantillons sanguins issus de plusieurs groupes de souris infectées, durant la phase aiguë et la phase chronique de la Maladie dans le modèle expérimental.

Ces résultats confirment que la *TcPRAC* est bien un biomarqueur diagnostique de la présence du parasite chez l'hôte mammifère. Ils sont présentés en détail dans les pages suivantes dans l'article n°1.

Par ailleurs, nous avons mis au point un test d'immunofluorescence direct capable de détecter les formes non infectantes de *T. cruzi* par l'utilisation des anticorps anti-*TcPRAC* (Figure 7). Les sérums polyclonaux anti-*TcPRAC* de lapin (A) et d'alpaca (B) ont montré une forte réactivité sur les parasites de culture fixés. Mis à part une faible réactivité de l'anticorps monoclonal #13C4B5, ce test n'a pas fonctionné lorsque nous avons utilisé les 7 autres anticorps monoclonaux anti-*TcPRAC* de souris (C). Malgré une bonne reconnaissance des formes épimastigotes par les sérums polyclonaux anti-*TcPRAC*, la détection directe des formes trypomastigotes sur des frottis sanguins utilisant un test d'immunofluorescence n'a pas été possible (données non montrées).



**Figure 7 : Détection du parasite avec différents anticorps anti-*TcPRAC* par immunofluorescence directe**  
 Des formes épimastigotes de *T. cruzi* ont été fixées par une solution de paraformaldéhyde à 4% et perméabilisées avec du Triton X-100 à 0,2% sur des lames. (A) Utilisation du sérum polyclonal de lapin anti-*TcPRAC* dilué au 1/300<sup>e</sup> révélé par des anticorps de chèvre anti-Ig de lapin - Alexa 488 dilués à 2µg/ml. (B) Utilisation du sérum polyclonal d'alpaca anti-*TcPRAC* au 1/300<sup>e</sup> révélé par des anticorps de lapin anti-Ig d'alpaca - Alexa 488 dilués à 10µg/ml. (C) Utilisation des 8 anticorps monoclonaux de souris anti-*TcPRAC* dilués à 10µg/ml révélés par des anticorps de chèvre anti-IgG de souris dilués au 1/1000<sup>e</sup>. Les sérums naïfs de chaque espèce ont été utilisés comme témoins négatifs. Une solution de DAPI à 1µg/ml a été utilisée pour marquer le noyau des parasites. Les acquisitions des signaux de fluorescence de l'Alexa 488 ont été réalisées sur un microscope à fluorescence Olympus FV1000 MPE.

### III.2. Utilisation de la *TcPRAC* comme biomarqueur pour l'efficacité post-traitement

Les méthodologies sérologiques et moléculaires, précédemment présentées, nous permettent de détecter le parasite dans des échantillons biologiques murins prélevés aussi bien durant la phase aiguë que la phase chronique dans le modèle expérimental. En plus des contraintes diagnostiques, toujours d'actualité pour la Maladie de Chagas, une autre problématique courante est la difficulté de se prononcer sur l'efficacité des traitements pour les patients chagasiques en phase chronique. Afin de répondre à la deuxième partie de la première hypothèse de travail, nous avons testé la capacité de la *TcPRAC* à être utilisée en tant que biomarqueur de l'efficacité d'un traitement.

Pour cela, nous avons testé et analysé, grâce à différents groupes de souris infectées, traitées ou non avec le benznidazole, les différentes méthodologies permettant la détection de la *TcPRAC*, les gènes codants pour la *TcPRAC* ou les anticorps de souris dirigés contre cette dernière. Pour contourner la complexité liée à la mortalité élevée, observée au cours de la phase aiguë, due à une hyperparasitémie, nous avons également infecté des groupes de souris avec un nombre moins important de parasites afin que la majorité des souris entre en phase chronique (au moins jusqu'à J100 post-infection).

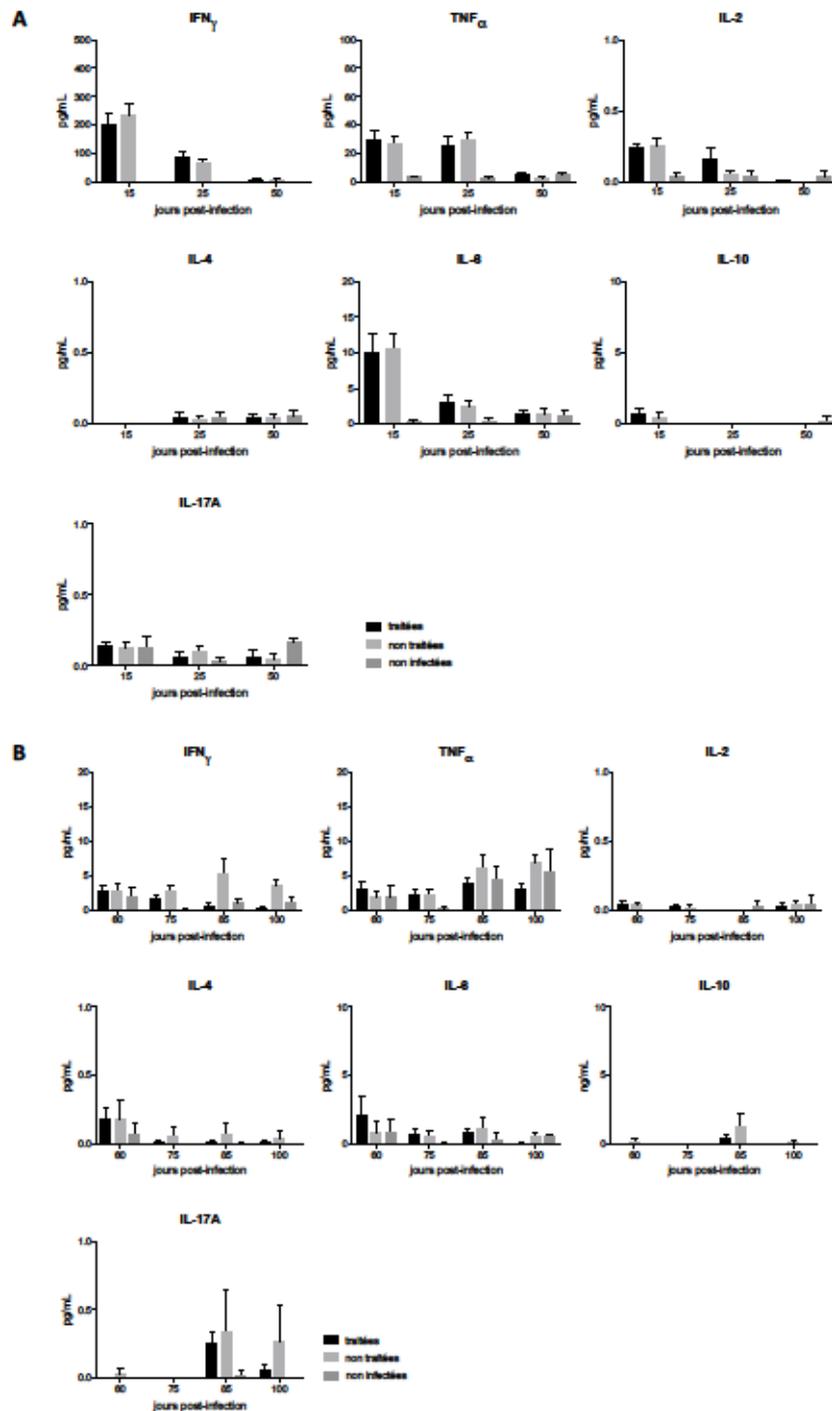
Les résultats obtenus ont montré :

- i. Les taux de *TcPRAC* circulante deviennent négatifs chez le groupe de souris « traité » pendant la phase aiguë et diminuent de façon significative chez le groupe de souris « traité » pendant la phase chronique comparativement aux groupes « non traités ».
- ii. Ces données sont confortées par les résultats obtenus après le dosage des IgG anti-*TcPRAC*. Ces taux sont proches de zéro pour le groupe de souris « traité » pendant la phase aiguë et nous avons observé une séroconversion de ces anticorps, de façon significative, chez le groupe de souris « traité » pendant la phase chronique environ 30 jours après la fin de la période de traitement.
- iii. De plus, l'amplification des gènes *TcPRAC* par PCR en temps-réel a montré une charge parasitaire indétectable (inférieure à 10 parasites/ml) pour les groupes « traités » aussi bien pendant la phase aiguë que pendant la phase chronique alors que la présence du parasite est toujours détectée chez les groupes « non traités ».

Ces résultats montrent que la *TcPRAC* pourrait être un biomarqueur de suivi de l'efficacité d'un traitement antiparasitaire. Ils confortent l'efficacité du benznidazole lorsqu'il est utilisé au début de l'infection. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure la présence d'un taux même faible de parasites chez les individus traités. Ces résultats sont présentés en détail dans les pages suivantes dans l'article n°1.

En parallèle, nous avons effectué le suivi du profil cytokinique de ces mêmes échantillons pour la recherche d'autres marqueurs durant la phase aiguë et la phase chronique. Pour cela, nous avons effectué le dosage des cytokines majoritaires, impliquées dans une réponse de type Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , IL-2), de type Th2 (IL-4, IL-6, IL-10) ou de type Th17 (IL-17A). Des sérums de souris non infectées, élevées dans les mêmes conditions, ont également été prélevés aux mêmes jours afin de servir de témoins négatifs, c'est à dire en condition non pathologique.

Les résultats de ces expériences sont montrés dans la Figure 8 (page suivante). Nous pouvons observer que durant la phase aiguë (panel A), la majorité des cytokines exprimées correspond à une réponse de type Th1. Un pic de production, principalement d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$ , caractéristique de l'infection par *T. cruzi*, est observé à J15 et entre J15 et J25 post-infection respectivement, sans différence significative entre les souris « traitées » et « non traitées ». Cette production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  persiste pendant la phase chronique de l'infection (panel B) à des taux plus faibles que pendant la phase aiguë. A partir du 5<sup>ème</sup> jour après la fin de la période de traitement (J75), nous avons observé une différence significative de l'expression d'IFN $\gamma$  où la production diminue de façon distincte pour les souris « traitées » tandis que cette dernière semble perdurer pour les souris « non traitées ». Par contre, mise à part une relative expression d'IL-6 au début de l'infection, aussi bien chez les souris « traitées » que chez les souris « non traitées », nous n'avons pas observé d'augmentation remarquable du taux des cytokines relatives à une réponse de type Th2 ou de type Th17.



**Figure 8 : Dosages des cytokines sériques de souris traitées ou non par le benznidazole**

Des groupes de 7 souris Balb/c mâles âgés de 6 semaines ont été infectés par voie intrapéritonéale avec  $10^4$  ou  $10^3$  trypomastigotes (souche CL Brener) pour l'étude comparative du profil d'expression cytokinique liée au traitement par le benznidazole. Durant la phase aiguë, un groupe de souris a été traité pendant 10 jours avec 100mg/kg/j par gavage entre J5 et J15 post-infection (A). Un autre groupe a été traité de façon identique pendant la phase chronique de l'infection entre J60 et J70 post-infection (B). Les jours indiqués en abscisse sur les graphiques de la figure correspondent aux jours de prélèvement de sang périphérique utilisé pour l'obtention des sérums. Le dosage des cytokines a été effectué avec le kit *Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine* (BD Biosciences) en suivant les instructions du manuel. Les acquisitions ont été réalisées sur un cytomètre en flux Accuri C6 (BD Biosciences) et les analyses des données avec le logiciel FCAP Array Software (BD Biosciences).

## ARTICLE 1

**Specific serological and molecular tools for diagnosis of experimental Chagas infection and disease: towards a reliable test for diagnosis and monitoring of treatment efficacy.**

Nicolas Coatnoan, Guilherme Dias de Melo, Alain Cosson, Pierre Lafaye, Marc Bossus, Glaucia Paranhos Baccala, Emilio Brignoli and Paola Minoprio. Submitted.

**Specific serological and molecular tools for diagnosis of experimental Chagas infection and disease: towards a reliable test for diagnosis and monitoring of treatment efficacy.**

Nicolas Coatnoan<sup>1</sup>, Guilherme Dias de Melo<sup>1&</sup>, Alain Cosson<sup>1</sup>, Pierre Lafaye<sup>2</sup>, Marc Bossus<sup>3</sup>, Glaucia Paranhos Baccala<sup>3</sup>, Emilio Brignoli<sup>3</sup> and Paola Minoprio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Trypanosomatids Infectious Processes Laboratory, Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur, 28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

<sup>2</sup>Plateforme Ingénierie des Anticorps, Institut Pasteur, 28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

<sup>3</sup>bioMérieux, 376 Chemin de L'Orme, Marcy l'Etoile, 69280, France

Present addresses :

<sup>&</sup> Unité de Dynamique des lyssavirus et adaptation à l'hôte, Infection and Epidemiology Department, Institut Pasteur, 28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

<sup>\*</sup> Corresponding Author

Scientific Platform Pasteur – USP, Rua Prof. Lucio Martins Rodrigues, 370, Cidade Universitaria, Sao Paulo, SP, CEP 05508-012, Brazil

[paola.minoprio@pasteur.fr](mailto:paola.minoprio@pasteur.fr)

## SUMMARY

Chagas disease is a neglected disease, and currently, its transmission by blood transfusion has become a public health problem in Northern countries due to people migration. *TcPRAC* is an essential parasite enzyme, not present in humans and in other pathogenic trypanosomatids that confer a particular interest in terms of parasite specificity for diagnosis and criteria of cure. We have previously shown that *TcPRAC* gene and expression are closely related to the parasite viability. This has a particular importance for the chronic phases of Chagas disease where the parasite is almost exclusively intracellular and hardly detected, imposing serious difficulties for the diagnosis and for assessing cure after treatment. Herein, we describe molecular and serological approaches to Chagas disease diagnosis, with the *TcPRAC* as the main target, in order to improve the sensitivity and specificity of the existing diagnostic tests. In acutely and chronically *T. cruzi* infected mice, we have demonstrated the potential of such tests to detect the parasites, even in low parasitaemia animals, by the targeting of *TcPRAC* genes and the secreted/excreted *TcPRAC* in peripheral blood samples. Furthermore, after benznidazole treatment, mice diagnosed using our combined approach tended to become negative, what would pave the way to the development of new tests for the post-treatment evaluation and the validation of news drugs against Chagas disease.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, diagnosis, benznidazole, antibodies.

## INTRODUCTION

Chagas disease, caused by the kinetoplastid protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a major neglected disease that affects millions of people in South and Central Americas [1]. No vaccine or appropriate treatments are available for large-scale public health interventions. In the last decade, Chagas disease has gained a considerable importance in non-endemic regions and Northern countries due to progressive urbanization and the intensive migration of infected individuals and vectors [2]. The transmission of the parasite by blood transfusion is then a key issue. *T. cruzi* is a hemoflagellate protozoan parasite that infects different cell types of the mammalian host. In the acute phase of infection, parasites are easily found replicating in different tissues and organs, as well as circulating in the blood. As adaptive immune responses are stimulated, the high tissue parasitism is controlled, but never eradicated [3]. *T. cruzi* exhibits a high degree of intraspecific variability, as detected by biological, biochemical, immunological and genetic markers [4,5,6].

Current methods for the diagnosis of Chagas disease are unsatisfactory. Thus the diagnosis is based on the direct microscopic demonstration of parasites circulating in the blood or present in biopsies [7,8]. Additionally, poor serological tests exist and are based on the humoral response against major parasite antigens, or the presence of parasitic DNA in the blood. The main difficulty is that the parasite load is relatively easily detectable only during the acute phase because bloodstream forms of *T. cruzi* can be found in the peripheral circulation, i.e. approximately during the first 2 months of infection. In contrast, during the chronic phase, very few parasites circulate since *T. cruzi* is mainly present in deep tissues.

Consequently the available tests suffer from a good sensitivity. In endemic, predominantly rural areas, the majority of infected people are asymptomatic and therefore do not consult and are not screened. The problem is amplified by the considerable genetic variabilities between different strains of *T. cruzi* and the frequent co-infections with other parasites present in endemic areas for Chagas disease, such as *Trypanosoma rangeli* or *Leishmania* spp. Most of the existing techniques require invasive sampling and lack appropriate sensitivity and specificity, especially because of cross-reaction with these infectious agents [9].

Still today, WHO recommends 2-3 simultaneous serological tests to increase accuracy and decrease inconclusive results to less than 2% [10]. Three tests based on the detection of specific antibodies against the parasite are widely used and recommended for immunological diagnosis, in order to fill the low predictive value of current tests: indirect haemagglutination, indirect immunofluorescence, and enzyme immunoassay. Other commercially available diagnostic tests employ crude antigen preparations of *T. cruzi*, semi-purified fractions or recombinant antigens. Most of these tests have a sensitivity of 94% to 99.5% and a specificity of 94% to 96% and, therefore, are inconclusive and of low reproducibility. Accurate diagnosis is then essential for parasite detection in patients with unclear serology, to the follow up of the infection and to prevent transmission by the way of blood transfusions and organ transplantation. The development of molecular and serological methods should consider the phase of infection and is of utmost importance for better evaluation of treatment efficacy.

*TcPRAC* is an essential *T. cruzi* enzyme, not present in humans and in other human trypanosomatids [11]. The enzyme, is expressed in different parasite stages, independently of the *T. cruzi* genotype, has a mitogenic activity for host B cells, thus contributing for parasite persistence and fate [12,13]. We have previously shown that *TcPRAC* is a marker of parasite viability, since parasites submitted to genetic inactivation of *TcPRAC* gene, or functional gene knock down, are not viable [14]. This has a particular importance for the chronic phases of Chagas disease where the parasite is almost exclusively intracellular and hardly detected, imposing serious obstacles for the diagnosis and for healing criteria after treatment.

In order to address these questions and develop better epidemiological surveys and diagnostic tools, we have developed different tools and approaches using *TcPRAC* as the main target. Highly specific antibodies directed against *TcPRAC* were raised in rabbit, mouse and alpaca. Using bioinformatic tools, *TcPRAC* specific oligonucleotide sequences were also identified to be used in real time PCR. We evaluated groups of mouse sera and blood DNA collected during the course of acute and chronic infections before and after specific chemotherapy. Antibody-capture ELISAs were settled seeking to develop specific and sensitive diagnosis of *T.*

*cruzi* infection, even for animals showing extremely low parasitaemias, aiming at detecting the presence of circulating *TcPRAC* or anti-*TcPRAC* specific antibodies. Highly specific and sensitive real time PCR was set in motion to target specific parasite *TcPRAC* genes. As expected, and our combined data show that the methodologies using *TcPRAC* as target have increased specificity and potential to further validation using human cohorts aiming at an improved diagnosis of Chagas' infection, disease monitoring and post treatment cure. As expected, anti-*TcPRAC* antibodies raised in three different species were able to capture parasite secreted/excreted circulating *TcPRAC*, as well as mouse anti-*TcPRAC* antibodies during both the acute and chronic phases of the infection. In parallel, *TcPRAC* genes were efficiently amplified by real time PCR. ELISA and PCR assays have showed high specificity against the target since no cross reactions were obtained when using blood samples from mice infected with other trypanosomatids. Moreover, serology and molecular tests showed a tendency to be negative after drug treatment. Altogether, our combined data showed that the methodologies using *TcPRAC* as target offer increased specificity for a diagnostic and bear a potential for further validation using human cohorts aiming at an improved diagnosis of Chagas infection, disease monitoring and post-treatment evaluation.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Preparation of recombinant *TcPRAC***

Recombinant *Trypanosoma cruzi* proline racemase (EC 5.1.1.4) was produced in *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) and purified by immobilized metal affinity chromatography on nickel columns, as previously described [12].

### **Animal immunizations**

2 months-old New Zealand white rabbit was immunized at day 0 with 100 µg of recombinant *TcPRAC* in complete Freund adjuvant and every 15 days with 200 µg of recombinant *TcPRAC* in incomplete Freund adjuvant. 5 weeks-old Balb/c mice were immunized at days 0, 14 and 28 with 10 µg of recombinant

TcPRAC mixed with Ribi adjuvant. One young adult male alpaca (*Lama pacos*) was immunized with 100 µg of the recombinant TcPRAC in complete Freund adjuvant at day 0 and 100 µg of the recombinant TcPRAC in incomplete Freund adjuvant at days 21 and 35.

#### **Anti-TcPRAC sera and antibodies**

Anti-TcPRAC rabbit polyclonal and alpaca polyclonal serum were obtained from immunized animals and tested against TcPRAC recombinant protein. 8 mouse monoclonal antibodies anti-TcPRAC were produced by bioMérieux from immunized Balb/c mice immunized as here above: clones 13C4B5 (IgG2a), 5C9D7 (IgG1), 1F3E7 (IgG1), 6E6B2 (IgG2a), 2F6E12 (IgG1), 3D5C4 (IgG1), 4B8E2 (IgG1), 9A2D8 (IgG2a).

#### **Parasites**

Epimastigote forms of CL Brener (clone F11-F5) and Y [14] strains of *Trypanosoma cruzi* constitutively expressing luciferase, as described [15] were maintained by weekly passage in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium. Culture trypomastigote forms were obtained from culture supernatants of infected Vero cells maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL Life Technologies, Paisley, Scotland) supplemented with 10% FCS. Bloodstream trypomastigote forms were obtained after at least two passages *in vivo* in C3H/HeJ mice and used for infections.

#### **Mice, infections and treatments**

Animals were maintained under specific pathogen-free conditions in individually ventilated cages with 12h light/dark cycle and had access to food and water *ad libitum*. 6 weeks old male C3H/HeOujCrI; and 6 to 8 weeks old male BALB/cAnNRj and outbred Swiss RjOrl mice were purchased from Charles River laboratories (Saint-Germain-Nuelles, France) and Janvier laboratories

(Saint-Berthevin, France) respectively. Mice were infected intraperitoneally with 10<sup>3</sup> or 10<sup>4</sup> bloodstream forms of the CL Brener or Y strains, to obtain blood samples corresponding respectively to acute or chronic phases of the experimental model of infection and disease. For drug treatments, benznidazole was prepared from powder at 10 mg ml<sup>-1</sup> in PBS DMSO 5%. Whenever indicated, groups of seven mice were treated with 100 mg kg<sup>-1</sup> day<sup>-1</sup> for 10 consecutive days, between days 5 and 15 (for the acute phase mouse model) or between days 60 and 70 post-infection (for the chronic phase mouse model). At experimental end-points mice were euthanized under CO<sub>2</sub> gaz and samples collected.

#### **Mouse sera and total blood DNA samples**

Individual peripheral blood samples of treated or untreated groups of seven or twelve BALB/c or Swiss mice were obtained as indicated in the figures. Sera were obtained after centrifugation at 2500 rpm for 5 min at 4°C. Aliquots were prepared and frozen at -20°C. Total blood DNA were obtained individually by using the QIAamp DNA Mini and Blood Mini kit following the manufacturer's instructions (QIAGEN). Aliquots were frozen at -20°C until the analysis.

#### **Optical and imaging parasitaemia determination**

Optical parasitaemias were determined by counting 5 µl of peripheral blood in a Malassez counting chamber. To estimate the parasitemia by imaging, mice were injected concomitantly with 150 mg kg<sup>-1</sup> D-luciferin (Perkin Elmer) and with 15 mg kg<sup>-1</sup> xylazine (Rompun, Bayer lab., La Garenne-Colombes France) and with 100 mg kg<sup>-1</sup> ketamine (Imalgène, Merial lab., Lyon France) i.p, all diluted in PBS. To quantify the bioluminescence, mice were placed in an IVIS Spectrum system (Caliper Life Sciences) and images were

acquired 10 minutes after d-luciferin administration using Living Image 4.0 software. Exposure times varied between 1 second and 5 minutes depending on signal intensity. Regions of interest, corresponding to the whole mice body, were determined to quantify bioluminescence expressed as total flux (photons/second) by using Living Image 4.0 software. Detection threshold was obtained by using uninfected mice.

### **Real time PCR assays**

Primers and probes were selected from the full length *TcPRAC* genes sequences (GenBank Accession numbers AF195522 and AY140947) using the Primer3Plus© software from the Whitehead Institute for Biomedical Research. Specificity of the primers and probes were ascertained using BLASTn© software from the National Library of Medicine and sequences of *T. cruzi* strains, *Leishmania* spp and African trypanosomes. Unlabeled forward primer (5'-GGAAGGGATGCTCGTTGTAA-3'), unlabeled reverse primer (5'-TACGTAGCAGCACCTGTTTCG-3') and the probe labeled in 5' with (6-) carboxyfluorescein and in 3' with BHQ1 (black quencher) (5'-CCACACCATGCTGTTTGACC-3') were purchased from Eurofins genomics GmbH (Braunfels, Germany). Standard calibration curves were obtained by 10 fold serial dilutions of CL Brener or Y epimastigotes strains in non-infected mouse blood to result in a range of  $5.10^7$  to  $5.10^0$  parasites per mL of reconstituted blood. Total DNA extraction was then performed, as mentioned above. Reaction mix consisted of 1x Universal TaqMan© Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µM of each forward and reverse primer and 250 nm of probe in a total volume of 20 µL Reaction mix was performed in MicroAmp optical 96-well reaction plates (ThermoFisher, France) and PCR reactions were performed in triplicate as follow: 2 minutes incubation

at 50°C to activate UNG degradation, 10 minutes incubation to activate the hot-start DNA polymerase, and 40 cycles of 95°C for 15 seconds and 60°C for 1 minute. Quantitative PCR amplifications were performed on a QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR system and data were acquired on QuantStudio Software v1.3 (Applied Biosystems).

### **ELISA assays**

All ELISA assays were performed in 96 well Maxisorb plates (Nunc, France). The presence of circulating *TcPRAC* in infected mouse sera was determined by a sandwich ELISA assay where immunized rabbit or lama anti-*TcPRAC* serum were used for the capture diluted in PBS (1/5000 and 1/3000, respectively). Saturation, dilution of sera samples and second antibodies were done with PBS - Bovine Serum Albumin (BSA) 1%. Reactions were developed using anti-*TcPRAC* mouse monoclonal antibodies followed by appropriate dilution of goat anti-mouse IgG labeled with Horseradish Peroxidase (Sigma Aldrich). Serial dilutions of known amounts of recombinant *TcPRAC* (r*TcPRAC*) were used as standard. OPD or TMB substrate was used to reveal the HRP. Specific anti-*TcPRAC* antibodies in the mouse sera were detected by indirect ELISA, where the microplates were coated with r*TcPRAC* antigen (10 µg/mL in PBS for the capture). Saturation and dilution of sera samples and secondary antibodies were also done in PBS - BSA 1%. Development of the ELISA reaction was performed using HRP-goat anti-mouse IgG antibodies followed TMB substrate. Standard for quantification consisted of serial dilution of known amounts of 13C4B5 mouse anti-*TcPRAC* monoclonal antibody.

### **Ethical statement**

All animal work was carried out under project / agreement MENESR # 795. All protocols and procedures were

conducted in accordance with the project registered under number 2013–0047 and approved by the Institut Pasteur Ethics

Committee (CETEA) on November 12, 2014 in accordance to the European legislation/guidelines EU 2010/63.

## RESULTS

### **Generation of serological and molecular tools to detect TcPRAC**

In order to bypass the difficulties observed with current diagnostic assays for Chagas infection and disease, we chose to produce different biological tools to be used in serological and/or molecular approaches using TcPRAC as target, since this parasite protein has been shown as a highly specific *T. cruzi* moiety, produced throughout infection by different parasite stages and genotypes and which is absent in man and other human pathogenic and non-pathogenic trypanosomatids [12]. Thus, we used recombinant and purified TcPRAC to hyper-immunize rabbits, mouse and alpaca animals to raise specific antibodies. Rabbit and alpaca polyclonal sera were obtained and tested by Western blotting against different concentrations of recombinant TcPRAC. Rabbit and alpaca polyclonal antibodies recognize a 45kDa protein corresponding to the TcPRAC recombinant protein (Figure 1A, left and central panels). The same results were obtained with all the mouse monoclonal antibodies (mAb) produced, as shown by the representative 13C4B5 clone (Figure 1A right panel). To develop a sandwich ELISA assay for the capture of the circulating secreted/excreted TcPRAC, different combinations were tested by using these anti-TcPRAC antibodies. From the eight mAbs tested as detection antibodies, 13C4B5 mAb has shown one of the strongest signal (Figure 1B). The use of Horseradish peroxidase (HRP) labeled mAb 13C4B5 for revelation of immunoassays using anti-TcPRAC polyclonal sera displayed high detection threshold and very low amounts of rTcPRAC could be quantified: SC<sub>50</sub>

obtained with alpaca or rabbit polyclonal serum are  $1,032 \pm 0,064 \mu\text{g/ml}$  or  $0,974 \pm 0,111 \mu\text{g/ml}$  with limit detection estimated from the mean (plus 3 standard deviations) of the 12 blank samples of  $0,012 \mu\text{g/ml}$  or  $0,046 \mu\text{g/ml}$  respectively (Figure 1C). However the use of mAbs both for TcPRAC capture and revelation has shown the best potential in terms of sensitivity, as presented in Figure 1D with respectively 13C4B5 and 5C9D7 mAb. The half of saturation concentration (SC<sub>50</sub>) is  $0,49 \mu\text{g/ml}$  and the limit detection estimated from the blank value is  $3,5 \text{ ng/ml}$ . In parallel, conventional PCR was settled using a couple of reverse and forward primers to amplify one specific fragment of the TcPRAC genes, in reactions using genomic *T. cruzi* DNA. The results shown in Figure 2A reveal that an expected fragment of 174 bp is obtained when with genomic DNA from *T. cruzi* which is absent in the negative controls using genomic DNA from *Leishmania donovani* or *Trypanosoma vivax* (Figure 2A, left panel). Amplification of total blood DNA from a *T. cruzi* infected mouse was performed before and during the course of infection at days 0, 10 and 20 dpi. The results obtained showed that the primers are able to amplify by a conventional PCR a TcPRAC 174 bp fragment by day 20 dpi (Figure 2A, right panel). In order to increase the sensitivity of the test, we developed a TaqMan® qPCR using the same couple of primers and an internal labeled probe (Figure 2B). Data obtained with qPCR performed with the SYBR Green® reagent showed lesser sensitivity than TaqMan® qPCR because some traces of amplification were obtained in some negative controls using *T. vivax* genomic DNA which

possesses a proline racemase gene, identical to 59% of the *T. cruzi* proline racemase residues [16].

***Circulating TcPRAC and anti-TcPRAC antibodies can be detected in the sera/blood of infected mice***

We have previously showed that TcPRAC is secreted/excreted by *T. cruzi* upon infection contributing to the parasite escape and fate in the host. We have attempted to verify if the antibodies raised against the recombinant protein were able to detect the circulating TcPRAC produced by the parasite during infection. Since the parasite inoculum of the experimental model has to be different to permit the analyses of a significant group of individuals according to the parasite load to avoid mortality, we infected different groups of mice with  $10^4$  or  $10^3$  parasites, to study respectively acute or chronic phases of murine infection. Figures 3A and 3B present the results obtained with the groups infected respectively with the CL and Y strains of *T. cruzi*. It can be observed that the optical determination of the parasite numbers in the blood is possible for mice infected with both polar strains during the acute phase of infection. The same is not possible after 50-60 days, which corresponds to the chronic stages of infection where the parasite is circulating in low numbers, or only present in the host tissues. Parasitaemia values obtained with *in vivo* imaging were similar to that obtained by optical determination. However, the sensitivity of those methods is lesser around  $\leq 10^4$  parasites/mL of blood both by bioluminescence counting and optical determination.

Taking into consideration the internal standard composed by rTcPRAC in capture assays (see Figures 1B and 1C), sandwich ELISAs were developed using total rabbit or alpaca polyclonal antibodies for coating microplates and

13C4B5 mouse mAb as developing reagent, either directly labeled with HRP or by using HRP-anti-mouse IgG secondary antibodies. Considerable amounts of circulating TcPRAC were detected both with acute and chronic mouse sera and not with the sera obtained from mouse negative controls infected with *T. vivax* or with *L. donovani* (Figure 4A). Comparable results were obtained when using the different eight mAbs produced as developing agents.

Validation of those data was obtained by qPCR of total mouse blood DNA using specific TcPRAC primers and probe. Parasite TcPRAC gene can be amplified all along the infection, even in the presence of low numbers of circulating parasites, such as 10 parasites/ml of blood (Figure 4B). Interestingly, while the humoral response in acute and chronic phases of infection is mainly composed by polyclonal IgM (0,1 - 0,4 mg/mL/mouse) and polyclonal IgG (5- 20 mg/mL/mouse) antibodies, whose majority is nonspecific of parasite antigens, it is possible to detect significant amounts of IgG antibodies directed to recombinant TcPRAC mitogen in all samples analyzed individually, using indirect ELISA assays (Figure 4C).

***Potential use of TcPRAC for monitoring post-treatment***

The encouraging results obtained here above with the present tools have prompt us to test the presence of TcPRAC circulating protein or its parasite expressed genes before and after benznidazole treatment of infected mice. Groups of 14 mice for acute and 14 mice for chronic phases were appropriately infected with the CL strain of the parasite. As indicated in the Figure 5A, seven mice per group were treated with benznidazole for 10 consecutive days and monitored by serology and qPCR before and after treatment. As expected,

since *TcPRAC* is only produced by live parasites, the decrease in parasite numbers observed along the treatment is concomitant with the decrease of *TcPRAC* detection in the sera of treated mice, as compared with untreated controls. Most of the animals presented negative results for the presence of circulating *TcPRAC* when they were treated in the acute phase of infection (Figure 5B). In contrast, the detection of circulating *TcPRAC* tends to decrease if the treatment occurs in the chronic phase of infection (Figure 5C). Similar

results were obtained by qPCR using total blood DNA obtained from mice acutely and chronically infected (Figure 5D and 5E). Serological data to detect specific IgG anti-*TcPRAC* produced during the infection before and after treatment (Figures 5F and 5G) corroborate these results, suggesting that *TcPRAC* expression and production is down-regulated after treatment suggesting that this target is potentially useful for monitoring the cure after treatment.

## DISCUSSION

In the present work, we describe serological and molecular assays using the *Trypanosoma cruzi* proline racemase (*TcPRAC*) as target for diagnosis and evaluation of the efficacy of Chagas disease treatment. Specific recognition of parasite *TcPRAC* genes, of circulating *TcPRAC* enzyme/mitogen and of anti-*TcPRAC* antibodies was possible in the mouse blood using specific oligonucleotides or specific antibodies generated in different animal species. These data support the phylogenetic studies demonstrating that *TcPRAC* genes are only present in the human pathogenic *T. cruzi* and absent in man and in other trypanosomatids, such as *Leishmania* spp and African trypanosomes [11]. These results suggest that new diagnostic tests for Chagas disease are indeed achievable goals and may constitute single alternatives to the current available methodologies that do not offer a good specificity for testing multiparasitized individuals living in endemic regions [17]. Our present results then contrast with old, but still ongoing recommendations of WHO for the diagnosis of Chagas disease [10] advocating for more than 2 tests to validate a concluding diagnostic.

Our results also showed that qPCR using primers and a labeled probe specifically designed for a *TcPRAC* gene fragment offered the possibility to detect around  $10^1$  *T. cruzi* parasites per mL of blood and do not amplify other sequences from negative controls. Others studies which have used primers to amplify nuclear DNA repeats, or kinetoplast DNA regions presented better sensitivity, however they still generate false positive PCR products, or amplify DNA material from closer non-pathogenic trypanosomes, e.g. *T. rangeli* [7,18,19]. The difficulties related were mainly the consequence of the high genetic variability of *T. cruzi* strains. We show here that this problem was circumvented since qPCR used in this work was sufficiently stringent to amplify the *TcPRAC* gene fragment from both CL and Y polar strains of the parasite. However, contrasting with other assays using primers directed to multicopy or tandemly repeated parasite genes, the detection threshold for *T. cruzi* numbers, limited to  $10^1$  in the present assay, may perhaps be increased if blood concentration methods are applied to the samples, as suggested by other groups [20], consequently enhancing sensitivity.

Immunoassays developed here to capture the *TcPRAC* protein secreted / excreted by *T. cruzi* bloodstream forms, showed a high potential to be used to specifically detect the circulating parasite protein in both acute and chronic phases of infection. Thus far, preliminar studies using a limited number of frozen sera from chronic infected individuals has proved that this can be indeed the case, since *TcPRAC* was detected in two out of five samples. However, a proof of concept using different well characterized cohorts of Chagas' patients is necessary to validate the results obtained here with the experimental model. One such a diagnostic test would be much more direct and conclusive of the presence of live parasites than the indirect methodologies which quantify antibodies in the sera, since finally would decrease the possibility of false positive reactions.

It is well known that the main difficulty of a diagnosis for Chagas disease in the chronic phase is mainly due to the low numbers of circulating parasites and to the unknown numbers of intracellular parasites present in deep tissues. Although the use of polyclonal rabbit and alpaca sera in indirect ELISA assays have provided sufficient sensitivity to be used in the detection of circulating *TcPRAC* in chronic phases of the experimental infection, polyclonal sera is not adequate for commercial diagnostic purposes in terms of reproducibility and traceability. Furthermore, in order to overcome this issue and to better increase the sensitivity of such an ELISA test by enhancing the chance to trap the *TcPRAC* during later phases of the disease, we generated specific mouse monoclonal antibodies, raised against the target. The set-up of ELISA assays using any combination of two of those monoclonal antibodies directed to different *TcPRAC* epitopes, respectively for capture and revelation, proved to be

ackward to detect any circulating *TcPRAC* in acute or chronic phases of infection, and was dependent on quality of sera and its conservation. In contrast, the detection limits of recombinant protein serial dilutions using the same monoclonal antibody combinations are almost 100 fold higher than that obtained with polyclonal sera. One explanation concerning these discrepancies could be that epitopes recognized by the selected mouse mAbs are conformational, modified by freezing or weakly represented in the native and active dimeric form of the *TcPRAC* released by the parasite. The recognition of those epitopes would thus be better recognized by the utilization of polyclonal sera.

Our results have also revealed that *TcPRAC* may be a good marker to be used in evaluation of drug treatment efficacy. Thus, we have previously shown that the protein is just expressed and secreted/excreted by alive parasites [13]. Therefore, the simple detection of *TcPRAC* in the blood would then undoubtedly result from the presence of live *T. cruzi*. This hypothesis seem to be indeed the case, since we show here the absence, or a strong reduction, of *TcPRAC* gene amplification in the blood after treatment, accompanied by a decrease in specific anti-*TcPRAC* antibody levels in the sera of benznidazole-treated mice. These data consolidate our hypothesis that molecular and serological tests using *TcPRAC* as target can be combined to ascertain the efficacy of the treatment against Chagas disease or yet be used for screening of new chemotherapies.

Appropriate efforts are been deployed to improve the present developed ELISA assay for the *TcPRAC* detection using specific recombinant single domain of heavy chain antibodies (nanobodies) from alpaca generated in the laboratory. Those nanobodies, described as having

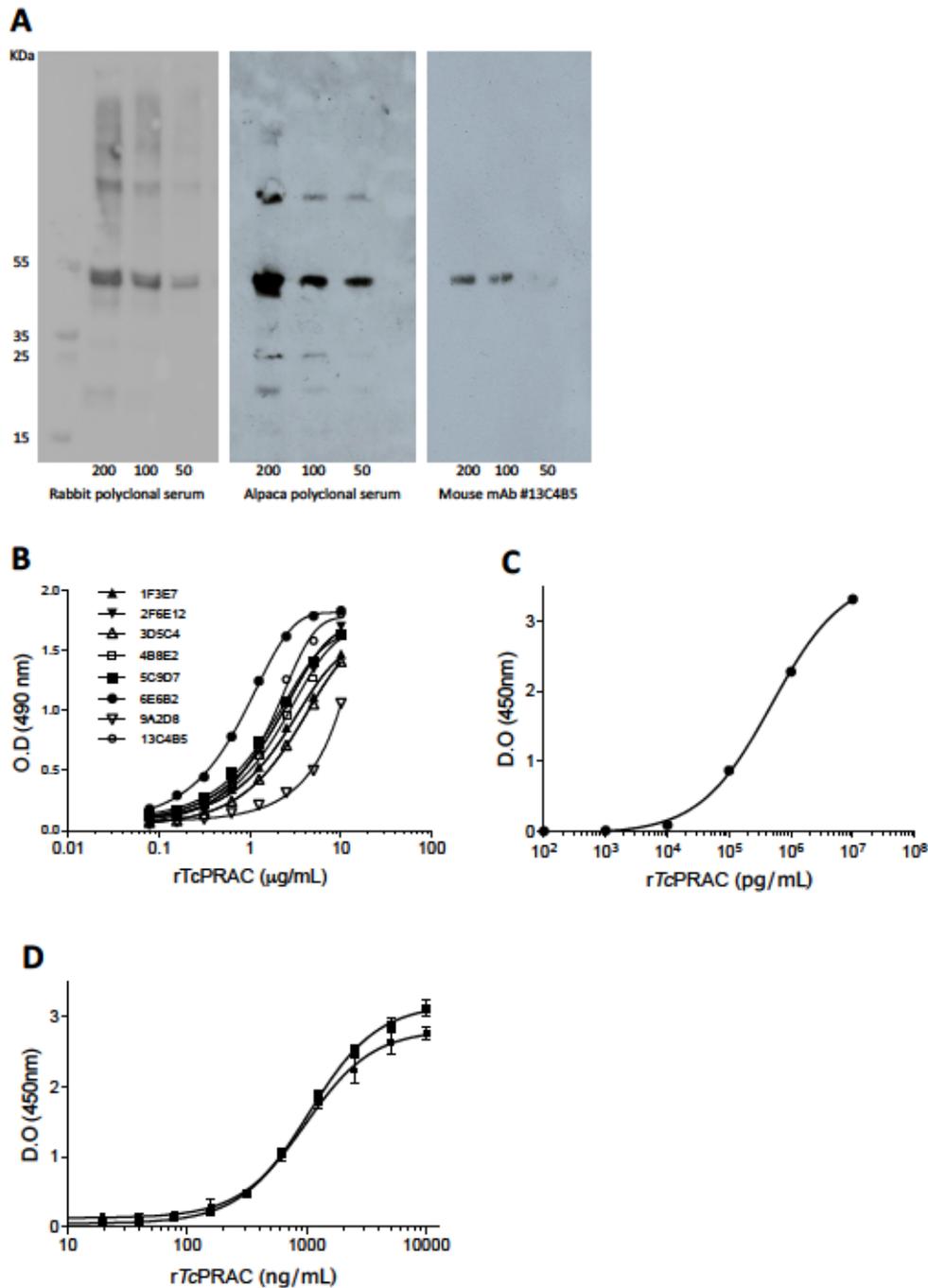
the capacity to recognize other epitope conformations than conventional antibodies, such as cryptic or concave epitopes [21] will be used to validate our results with cohorts of Chagas patients.

### **Acknowledgments**

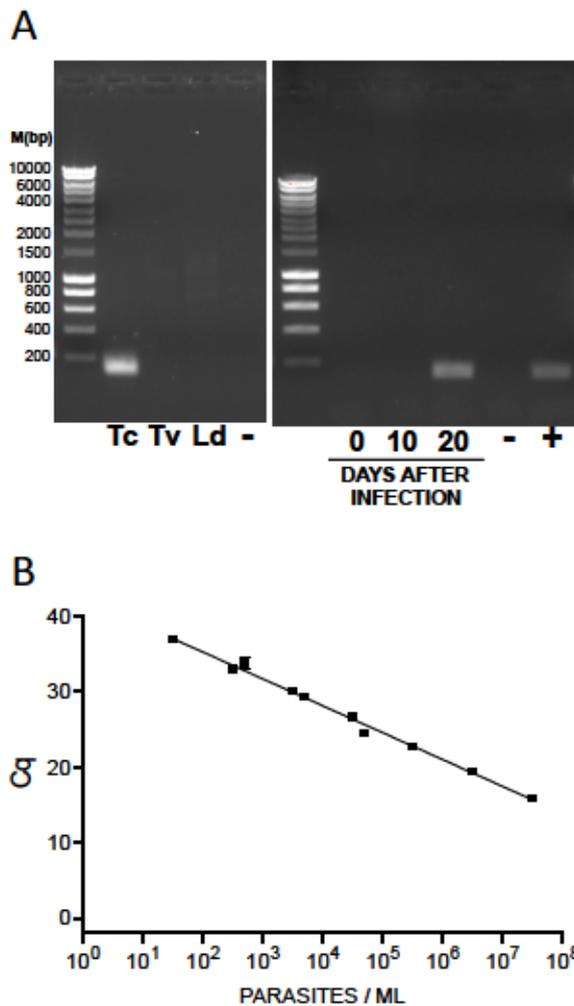
We thank Isabelle Casademont at Pasteur Institute of Paris (France) for her help with the qPCR settings. We are grateful to Dr Maria N Sato, Dr Ester Cerdeira Sabino and Dr Lea Campos de Oliveira at the Tropical Medicine Institute of Sao Paulo (Brazil) for preliminary studies on sera of Chagas' patients.

## REFERENCES

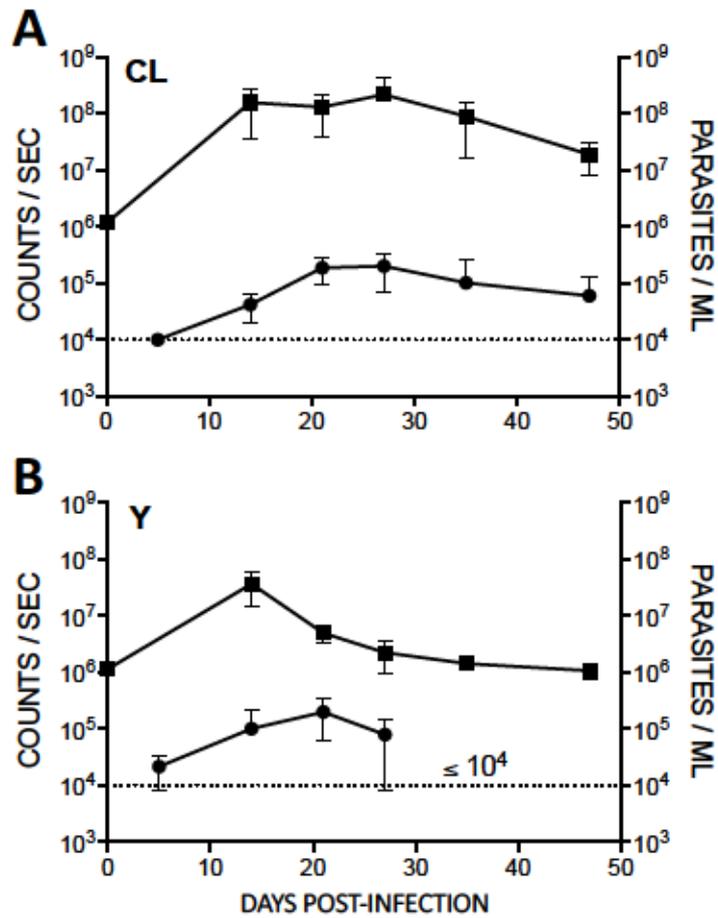
- [1] WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and Leishmaniasis. Technical report series no. 975. 2012.
- [2] Coura JR, Vinas PA. Chagas disease : a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465(7301):S6-7.
- [3] Cardillo F, de Pinho RT, Antas PR, Mengel J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*. 2015 ; 73(9):ftv082.
- [4] Requena-Méndez A, Lopez MC, Angheben A, Izquierdo L, et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers : a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 ; 11(9):957-976.
- [5] Pinazo MJ, Thomas MC, Blua J, Perrone A, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Infect Ther*. 2014 ; 12(4):479-496.
- [6] Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*. 2015 ; 17(5):605-615.
- [7] Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease : diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*. 1995 ; 21:551-555.
- [8] Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 ; 104:115-121.
- [9] World Health Organization. Anti-*Trypanosoma cruzi* Assays: operational characteristics, report 1 ; 2010.
- [10] World Health Organization. Control of Chagas disease : second report of the WHO Expert Committee. 2002 ; WHO technical report series, 905.
- [11] Caballero ZC, Costa-Martins AG, Ferreira RC, P Alves JM et al. Phylogenetic and syntenic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. *Parasit Vectors*. 2015 ; 8:122.
- [12] Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*. 2000 ; 6(8):890-897.
- [13] Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemase are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2005 ; 58(1):46-60.
- [14] De Sousa MA. A simple method to purify biologically and antigenically preserved bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* using DEAE-cellulose columns. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1983; 78(3):317-333.
- [15] Goyard S, Dutra PL, Deolindo P, Autheman D, D'Archivio S, Minoprio P. In vivo imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. *Parasitol Int*. 2014 ; 63(1):260-268.
- [16] Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Minoprio P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. *Mol Biochem Parasitol*. 2009 ; 165(2):170-179.
- [17] Cervantes-Landin AY, Martinez I, Schabib M, Espinoza B. High molecular weight proteins of *Trypanosoma cruzi* reduce cross-reaction with *Leishmania* spp. In serological diagnosis tests. *Biomed Res Int*. 2014 ; 2014:365403.
- [18] Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, Da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Dis*. 2012; 6(7):e1689.
- [19] Obishakin E, Stijlemans B, Santi-Rocca J, Vandenberghe I, Devreese B, Muldermans S, Bastin P, Magez S. Generation of a nanobody targeting the paraflagellar rod protein of trypanosomes. *PLoS One*. 2014 ; 9(12):e115893.
- [20] Fitzwater S, Calderon M, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, et al. Polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 ; 79:768-770.
- [21] Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013 ; 82:775-797.



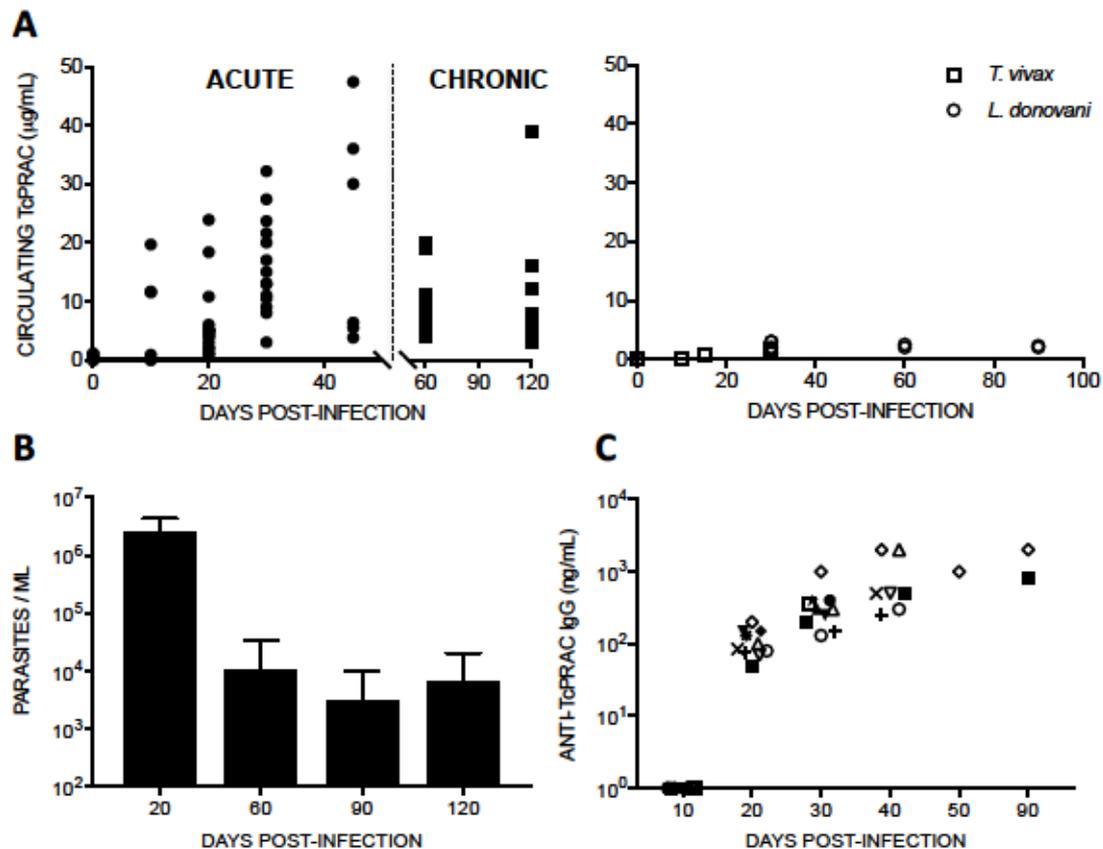
**Fig. 1. (A)** Detection of recombinant *TcPRAC* by Western blot analysis using polyclonal rabbit and alpaca sera, and 13C4B5 mouse monoclonal antibody, directed against *TcPRAC*. Quantities are indicated in the figure in nanogram. Molecular weights are shown (KDa). **(B)** ELISA assay set-up on serial dilutions of *rTcPRAC* (10  $\mu\text{g/ml}$  to 80 ng/ml) by using polyclonal alpaca serum for capture and the different mouse monoclonal antibodies generates anti-*TcPRAC*: 6E6B2, 13C4B5, 5C9D7, 4B8E2, 1F3E7, 2F6E12, 3D5C4, 9A2D8 (indicated in the figure), followed by goat-anti mouse IgG labeled to horseradish peroxidase for revelation. **(C)** ELISA assay set-up on serial dilutions of *rTcPRAC* (10  $\mu\text{g/ml}$  to 0,1 ng/ml) by using 13C4B5 mAb for capture and 5C9D7 mAb HRP labeled for revelation. **(D)** ELISA assay set-up serial dilutions of *rTcPRAC* (10  $\mu\text{g/ml}$  to 10 ng/ml) by using polyclonal rabbit (black circles) or alpaca (black squares) serum for capture and 13C4B5 mAb HRP labeled for revelation. Standard curves shown in the figures are representative of at least 3 independent experiments.



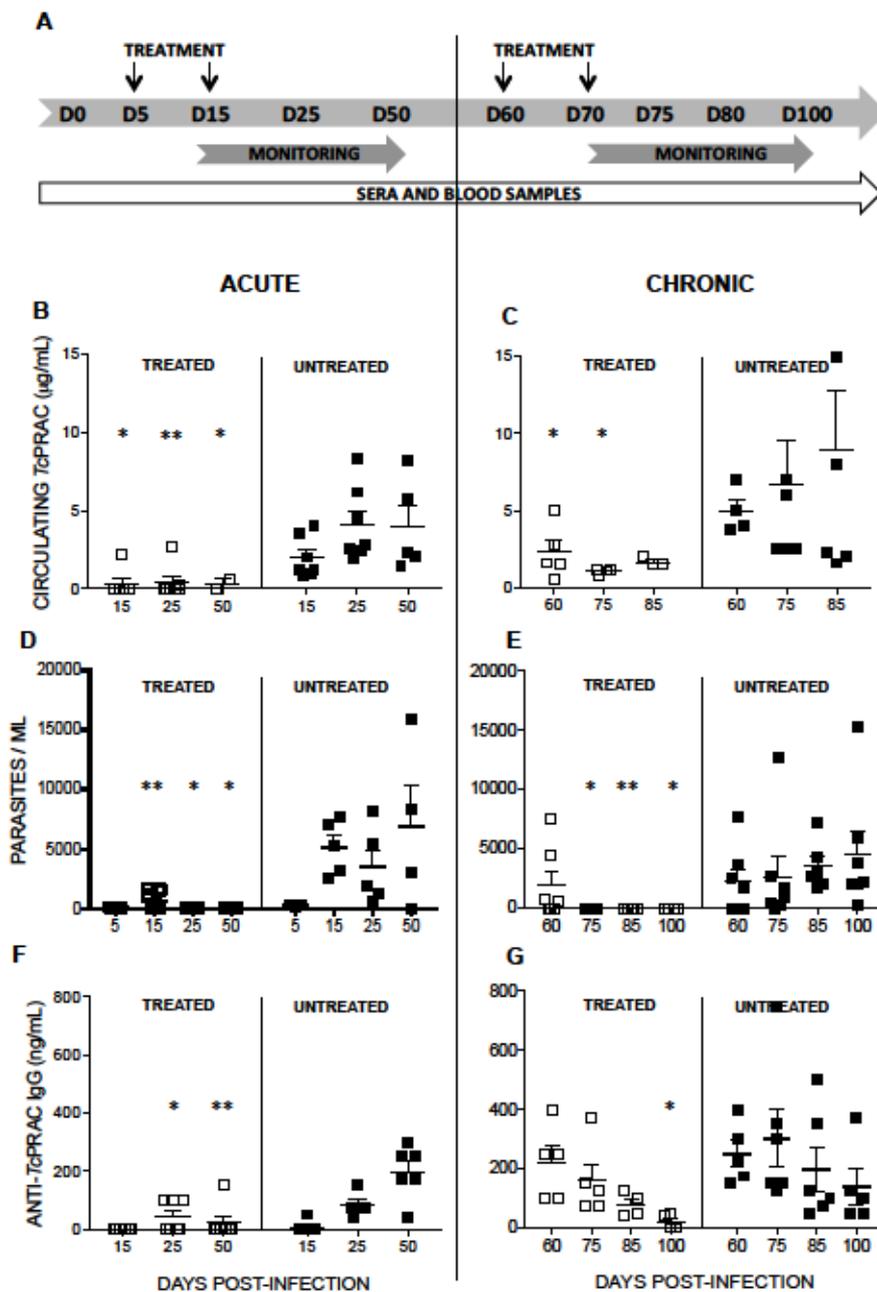
**Fig. 2. (A, left panel)** Gel electrophoresis showing a 174 pb *TcPRAC* gene detection PCR product by using specific forward and reverse *TcPRAC* primers on 50 ng of genomic DNA from *T. cruzi* CL Brener strain (Tc), *Trypanosoma vivax* (Tv) or *Leishmania donovani* (Ld) infected mice. **(A, right panel)** *TcPRAC* gene detection by PCR performed on total peripheral blood DNA from a *T. cruzi* infected mouse during the course of acute infection (days 10 and 20) as compared to non-infected mouse with the designed specific primers. Controls correspond to reactions with (+) or without *T. cruzi* genomic DNA (CL Brener strain). The results shown in the figure are representative of at least 3 different experiments. **(B)** *T. cruzi* standard calibration curve performed by qPCR with the calibration plot of parasites concentration versus quantitative cycles. Known amounts of *T. cruzi* epimastigote forms were spiked and serial diluted in normal fresh mouse blood and total DNA extraction was performed individually for all the samples. Quantitative cycles (Cq) were obtained for each parasite concentration ranging from 10<sup>0</sup> to 10<sup>7</sup> parasites/mL in triplicate. By plotting these averaged Cq values with the corresponding parasites concentration values, a linear calibration curve, from the average of five independent experiments, was obtained:  $y = -3,561x + 42,41$ .  $y = Cq$  values;  $x =$  parasites concentration values. The dynamic range of the *TcPRAC* genes DNA based qPCR obtained is 10<sup>7</sup> to 10<sup>1</sup> parasites/ml. Slope = -3,561, efficiency = 90,91%, R square: 0,9931.



**Fig. 3.** Representation of the individually parasitaemias obtained during the course of an acute infection. Twelve Swiss mice infected intraperitoneally with  $10^4$  *T. cruzi* parasites, CL strain (**A**) and Y strain (**B**), using optical microscopy (black circles, parasites/ml) or bioluminescence imaging (black squares, counts/sec). The results shown are the average means  $\pm$  SD of the means.



**Fig. 4. (A)** Quantification of circulating *TcPRAC* by sandwich ELISA assays. Rabbit anti-*TcPRAC* polyclonal serum and 13C4B5 mAb were used for the capture and for the revelation respectively. Circulating *TcPRAC* quantifications were obtained with a standard curve using known amounts of *rTcPRAC*. Results represent individual concentration of circulating *TcPRAC* expressed in µg/mL. Black squares: infected mice sera with 10<sup>4</sup> parasites/mouse for acute phase studies. Black circles: infected mice sera with 10<sup>3</sup> parasites/mouse for chronic phase studies. Negative controls represent *T. vivax* or *L. donovani* infected mice sera and are shown in the right panel. Results are representative of at least 3 independent experiments. **(B)** TaqMan qPCR analysis for *TcPRAC* gene fragments amplification. Specific reverse and forward primers and an internal labeled probe were used as indicated in the Material and Methods. Figures represent the average number of parasites per ml of blood obtained during the course of infection of twelve BALB/c mice infected intraperitoneally with 10<sup>3</sup> *T. cruzi* (CL strain), as compared to a standard linear regression curve (see Figure 2B). **(C)** Quantification of anti-*TcPRAC* IgG by indirect ELISA assays. Results are represented individually in ng per ml. *rTcPRAC* and anti-mouse IgG HRP labeled were used for the capture and for the revelation respectively. Sera were obtained from twelve individual mice infected with 10<sup>4</sup> parasites/mouse for acute phase studies.



**Fig. 5.** Monitoring post-treatment analysis during the acute and chronic phases of infection. **(A)** Seven mice per group were infected intraperitoneally with  $10^3$  CL strain of *T. cruzi*, untreated or treated during 10 consecutive days with  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  of benznidazole and monitored during the infection. Animals were bled at days 0, 15, 25, 50 (for acute phase studies) and at days 60, 75, 85 and 100 (for chronic phase studies). Quantification of circulating TcPRAC in treated and untreated mice sera during the acute **(B)** or the chronic **(C)** phases of infection are expressed in  $\mu\text{g per mL}$ . Detection of TcPRAC genes by qPCR in total peripheral blood DNA obtained from treated and untreated mice during the acute **(D)** or the chronic **(E)** phases of infection are expressed in parasites per ml. Quantification of anti-TcPRAC IgG in treated and untreated mice sera during the acute **(F)** or the chronic **(G)** phases of infection are expressed in ng per mL. Scatter dot plots are represented for all the data. Data are shown as the mean  $\pm$  SEM. Unpaired parametric t test. \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,001$ .

### III.3. Du modèle expérimental aux premiers essais chez l'Homme

Nous avons pu tester, en aveugle, une cohorte restreinte constituée de 10 patients chagasiques chroniques suivis à l'Institut de Médecine Tropicale de São Paulo (IMT - Université de São Paulo) et 10 sérums négatifs pour la Maladie de Chagas. De ces 10 individus malades, tous traités pendant 2 mois avec le benznidazole, nous avons testé les sérums prélevés avant traitement et prélevés 6 mois post-traitement. Pour ces patients, 2 tests PCR utilisant les amorces TcZ1/TcZ2 (amplifient une région de l'ADN nucléaire) et les amorces S35/S36 (amplifient une région de l'ADNk) ont été réalisés afin d'évaluer la réponse ou non au traitement. Un tableau récapitulatif concernant l'âge, le sexe, le statut clinique et les résultats des PCR avant et après traitement pour chaque patient est représenté dans la Figure 9.

Figure 9 : Tableau d'informations concernant la cohorte chagasique chronique

ID du patient	Sexe (âge)	PCR avant traitement	PCR après traitement*	Statut clinique	TcPRAC** avant traitement	TcPRAC** après traitement
8	♂(43)	+	-	Cardiaque	250 ng/ml	150 ng/ml
11	♂(48)	+	-	Cardiaque	250 ng/ml	150 ng/ml
12	♂(59)	+	-	Cardiaque	-	-
15	♀(43)	+	-	Indeterminé	-	-
16	♀(52)	+	-	Indeterminé	-	-
82	♂(56)	+	+	Indeterminé	-	-
111	♂(44)	+	+	Indeterminé	-	-
1	♀(57)	+	+	Digestive	-	-
61	♂(57)	+	+	Mixte	-	-
102	♂(35)	+	+	Mixte	-	-
506	nd	nd	nd	NI IMT***	-	-
509	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
517	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
537	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
539	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
540	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
541	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
550	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
553	nd	nd	nd	NI IMT	-	-
567	nd	nd	nd	NI IMT	-	-

\* PCR réalisées à 2 mois, 6 mois et 12 mois post-traitement

\*\* Détection de la TcPRAC circulante par ELISA sandwich

\*\*\* Témoins non-infectés. Informations concernant l'âge et le sexe non disponibles

Sur les 10 individus infectés et traités de la cohorte, la moitié n'aurait pas répondu au traitement car les PCR effectuées après traitement sont toujours positives (surligné en gris

dans le tableau). Au début du traitement, 4 patients étaient dans la phase chronique indéterminée, 3 présentaient une cardiopathie chagastique, 1 une forme digestive et 2 une forme mixte de la Maladie.

Pour détecter la *TcPRAC* circulante dans ces échantillons, nous avons utilisé 2 tests ELISA sandwich direct utilisant 2 combinaisons d'anticorps : le sérum polyclonal d'alpaca anti-*TcPRAC* ou l'AcM anti-*TcPRAC* #5C9D7 pour la capture et l'AcM anti-*TcPRAC* #13C4B5 marqué HRP pour la révélation. Avec les 2 combinaisons du test, nous avons détecté la *TcPRAC* circulante dans les sérums correspondant aux malades #8 et #11, avant et après la période de traitement par le benznidazole. De plus, les 10 sérums issus des individus non chagastiques se sont avérés négatifs avec les 2 tests. Il est important de souligner que ces deux individus (#8 et #11) font partie des trois patients présentant une cardiopathie chagastique déclarée (électrocardiogramme positif et dilatation cardiaque confirmée par échographie). Par contre, ces 2 individus appartiennent au groupe des patients considérés comme « traités » comme l'indiquent les résultats négatifs des PCR après traitement.

Bien que le nombre d'individus testés est réduit, ces données suggèrent que le parasite est toujours présent chez ces deux individus, car la *TcPRAC* ne peut être sécrétée/excrétée que par des parasites vivants. Nous avons agencés les résultats obtenus dans un tableau de contingence prenant en compte tous les sérums testés (voir Figure 10). Les caractéristiques intrinsèques et extrinsèques obtenues ont également été calculées spécifiquement pour les individus présentant une cardiopathie chagastique avec un même nombre de témoins négatifs.

Figure 10 : Tableau de contingence concernant la cohorte chagastique chronique

		Total de la cohorte	Cohorte des cardiopathes
Prevalence	m / n	50 %	50 %
Sensibilité	VP / m1	20 %	66 %
Spécificité	VN / m0	100 %	100 %
VPP*	VP / VP + FP	100 %	100 %
VPN**	VN / VN + FN	55 %	75 %

VPP = Valeur Prédictive Positive

VPN = valeur Prédictive Négative

Par ailleurs, nous avons eu la possibilité de tester 6 plasmas (et 4 plasma négatifs pour la Maladie de Chagas) issus d'une cohorte d'enfants chagastiques en phase aiguë provenant de l'Institut Oswaldo Cruz, FIOCRUZ (Rio de Janeiro). Un tableau concernant l'âge, le sexe, le statut clinique et les résultats des tests sérologiques pour chaque enfant est représenté dans la figure 11. Aucun des plasmas testés n'a montré une positivité pour la *TcPRAC* circulante, dans les tests ELISA sandwich utilisant les différentes combinaisons d'anticorps anti-*TcPRAC*.

Figure 11 : Tableau d'informations concernant la cohorte chagasique aiguë

ID du patient	Sexe (âge)	Type sanguin	Ig anti-T. cruzi	Statut clinique	TcPRAC**
61	nr	A	nr	NI*	-
64	nr	O	nr	NI	-
71	nr	O	nr	NI	-
73	nr	O	nr	NI	-
107	♂ (8)	O	IgM+/IgG+	Aigu	-
109	♂ (7)	A	IgG+	Aigu	-
110	♂(14)	O	IgM+/IgG-	Aigu	-
111	♂(7)	O	IgM+/IgG+	Aigu	-
112	♂(7)	O	IgG+	Aigu	-
113	♂ (11)	A	IgM+/IgG+	Aigu	-

\* NI = témoins non infectés

\*\* Détection de la TcPRAC circulante par ELISA sandwich

### III.4. Vers le développement d'un prototype permettant la détection du parasite intracellulaire *in vivo*

#### III.4.1. Sélection des V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC utilisés pour les études *in vitro* et *in vivo*

Nous avons sélectionnés 3 clones V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC (voir Figure 12) présentant de fortes affinités pour la *Tc*PRAC et des séquences différentes au niveau des régions CDR1 et CDR3 ainsi que des pI théoriques basiques, condition qui semble essentielle pour permettre une pénétration de ces anticorps dans les cellules (Li et al 2012). Les clones « Tc », #4 et #16 ont été produits. Le clone « Tc » a été marqué avec deux fluorochromes différents : l'Alexa 488 et l'IRDye 800 CW tandis que les clones #4 et #16 ont été marqués avec l'IRDye 800 CW.

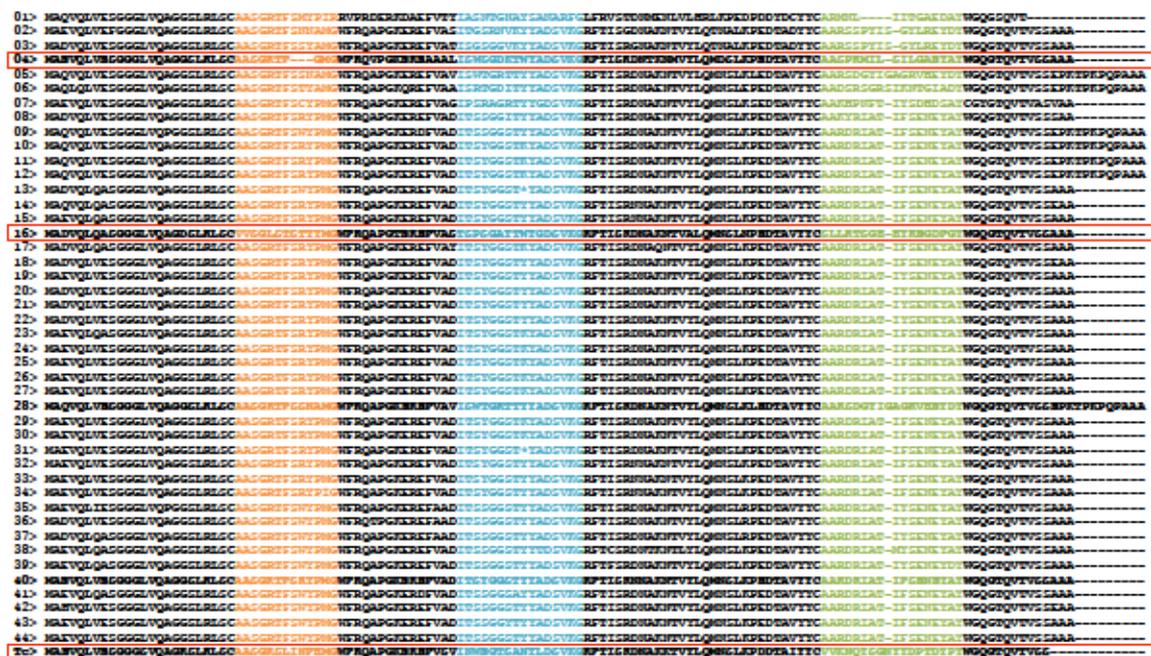
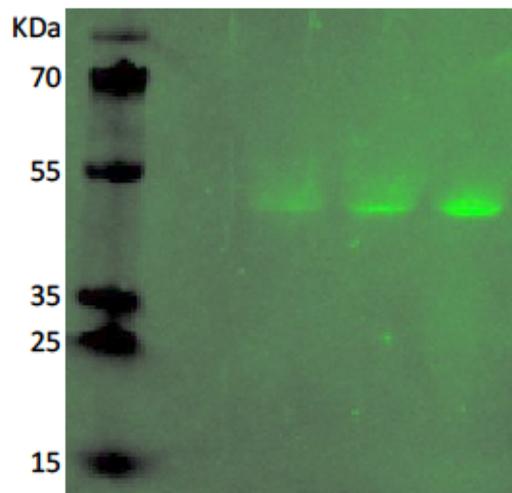


Figure 12. Aligment des séquences en acides aminés des clones V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC. Les séquences correspondantes aux régions conservées FR1, FR2, FR3 et FR4 (en noir) encadrent les régions hypervariables CDR1 (en orange), CDR2 (en bleu) et CDR3 (en vert). Les clones indiqués en gras sont ceux qui ont été choisis pour être exprimés et produits chez *E. coli* car ont présentés de fortes affinités pour l'antigène et également des séquences différentes, particulièrement au niveau des régions correspondant aux CDR1 et CDR3, suggérant la reconnaissance d'épitopes différents de la *Tc*PRAC. Les clones encadrés en rouge sont ceux qui ont été choisis pour être utilisés *in vitro* et *in vivo* car ils possèdent des points isoélectriques théoriques basiques. Les alignements de séquences ont été réalisés à l'aide du logiciel 4Peaks.

### III.4.2. Détection de la *Tc*PRAC intracellulaire et/ou membranaire *in vitro*

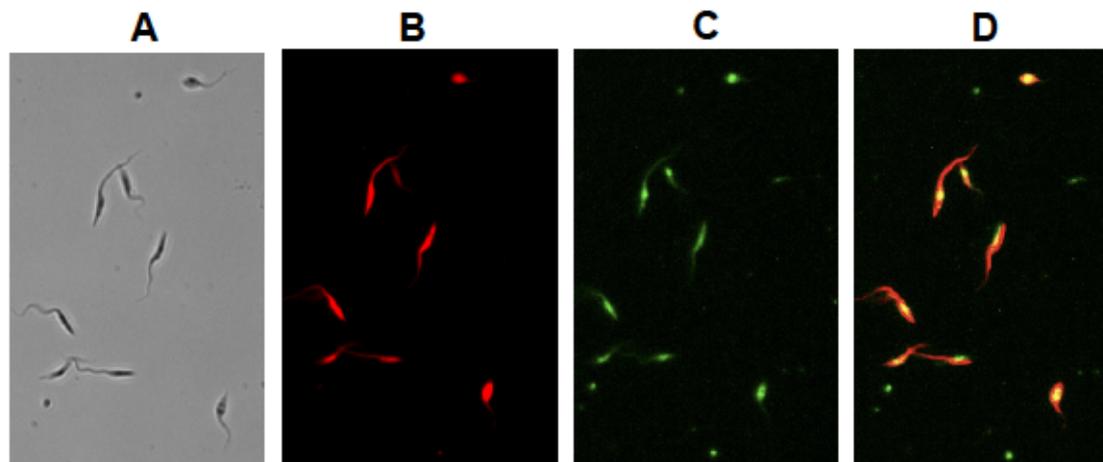
Dans un premier temps, nous avons vérifié et validé par la technique de Western blot que le marquage du clone V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC « Tc » avec l'Alexa 488 n'avait pas entraîné la perte de reconnaissance de cet anticorps pour la *Tc*PRAC (voir Figure 13).



**Figure 13 : Western blot utilisant le V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC couplé à l'Alexa 488**

Après dépôt et migration de différentes quantités de *Tc*PRAC recombinante (1µg, 2µg et 5µg) sur un gel de polyacrylamide à 4-12% puis transfert sur une membrane de nitrocellulose, cette dernière a été saturée en TBS lait 5% puis incubée avec le V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC marqué avec l'Alexa 488 à 5µg/ml en TBS-lait 5%. Après des lavages en TBS-Tween 0,5% puis en TBS seul, l'acquisition de la fluorescence a été directement effectuée à l'IVIS Spectrum aux longueurs d'onde 500nm / 540nm (excitation/émission).

Afin de montrer la possibilité de détecter la *Tc*PRAC membranaire et/ou intracellulaire du parasite, nous avons ajouté et incubé les V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC-Alexa 488 (clone « Tc ») en présence des formes épimastigotes CL Luc-red (voir Figure 14). A partir d'une concentration de l'anticorps de 10µg/ml, nous avons mis en évidence la possibilité de détecter la *Tc*PRAC chez des parasites vivants grâce à la détection spécifique d'émission de signaux fluorescents verts au niveau du parasite c'est à dire correspondant à la fixation des anticorps V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC-Alexa 488. Une intensité des signaux fluorescents plus élevée a été observée dans la région cytoplasmique suggérant que ces anticorps sont capables de détecter la forme intracellulaire de la *Tc*PRAC. De plus, la spécificité des signaux a été confirmée par l'obtention d'images de co-localisation des signaux de fluorescence rouges et verts correspondants aux parasites CL Luc-red et aux V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC-Alexa 488, respectivement (voir Figure 14).



**Figure 14 : Détection de la TcPRAC intracellulaire par microscopie à fluorescence**

Des epimastigotes souche CL Luc-red en phase exponentielle ont été lavés en PBS puis incubés pendant 16h à 27°C avec les V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC-Alexa488 (10 µg/ml) en PBS-Glucose 0,5% ou dans le milieu LIT. Après plusieurs lavages en PBS, les acquisitions ont été effectuées sur un FLoid imaging system en contraste de phase (A), avec le filtre de fluorescence rouge (B) et le filtre de fluorescence verte (C). La co-localisation des signaux de fluorescence rouge et verte est montrée sur le panel D.

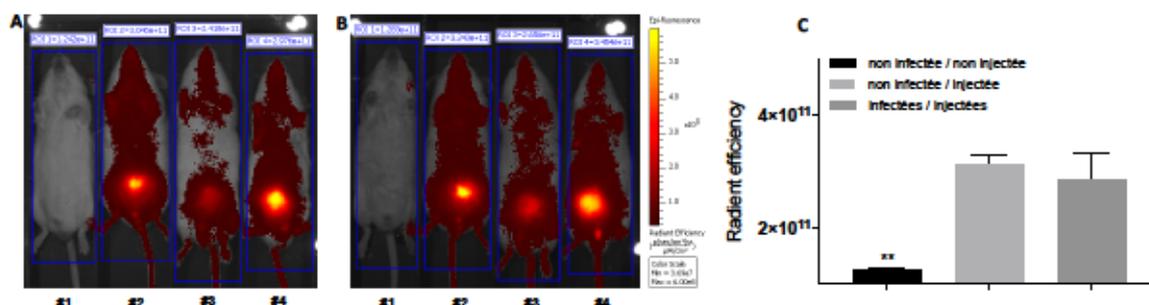
Nous avons tenté, avec ces mêmes anticorps (clone « Tc »), de détecter les formes amastigotes du parasite (souche CL Luc-red) dans un modèle d'infection cellulaire décrit au laboratoire. Différentes concentrations de V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC-Alexa488 (de 10µg/ml à 100 µg/ml) ont été ajoutées soit directement dans le milieu de culture des cellules infectées par les amastigotes CL Luc-red soit après fixation et perméabilisation de ces mêmes cellules. Contrairement aux résultats obtenus précédemment sur la forme épimastigote du parasite, aussi bien sur les cellules vivantes que sur les cellules fixées, nous n'avons pas pu mettre en évidence de signaux de co-localisation spécifique correspondant à un marquage de la TcPRAC intracellulaire et/ou membranaire des amastigotes CL Luc-red avec les V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC-Alexa488.

#### III.4.3. Détection de la TcPRAC intracellulaire et/ou membranaire *in vivo*

Pour détecter le parasite chez des souris chroniquement infectées, nous avons utilisé les 3 V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC marqués avec l'IRDye 800 CW. Ce fluorochrome émet dans l'infra-rouge lointain et nous a permis de s'affranchir des signaux de fluorescence « parasites », principalement émis par les aliments au niveau de la zone abdominale, en condition *in vivo* (Kwon et al 2012).

Dans une première expérience pilote, nous avons injecté, par voie intraveineuse, des V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC-IRDye 800 CW (clone « Tc ») à deux souris infectées chroniquement avec la souche CL Luc-red et à une souris non infectée. Une souris non infectée et non injectée (#1) nous a permis de contrôler l'absence d'émission de signaux fluorescents non spécifiques aux longueurs d'onde étudiées. Les acquisitions des signaux fluorescents (Figure 15) ont été réalisées 30 minutes (A) et 60 minutes (B) post-injection. Pour les 3 souris injectées avec les

anticorps marqués, de forts signaux fluorescents ont été localisés au niveau de la vessie, sans différence significative au niveau de la quantification de ces signaux (C) pour les souris infectées (#3 et #4) et pour la souris non infectée (#2). Nous n'avons pas observé de zone significative susceptible de correspondre à la présence du parasite.



**Figure 15 : Détection des VH anti-TcPRAC couplés à l'IRDye 800 CW *in vivo* (I)**

Quatre souris Swiss mâles âgées de 25 semaines ont été utilisées pour cette expérience. Une des deux souris non infectées (#2) et deux souris âgées de 8 semaines lors de l'infection en i.p par  $10^3$  trypanomastigotes de la souche CL Luc-red (#3 et #4), ont chacune été injectées en i.v. avec  $40\mu\text{g}$  de VH anti-TcPRAC couplé à l'IRDye 800 CW à J120 post-infection. Des acquisitions d'une durée de 1 seconde à l'IVIS® Spectrum™ aux longueurs d'onde de 745nm/800nm (excitation/émission) ont été réalisées 30 minutes (panel A) et 60 minutes (panel B) post-injection. Les moyennes des quantifications de fluorescence sur les régions d'intérêts (i.e. ROI), correspondant à la totalité du corps de chaque souris, sont représentées sous forme de graphique (panel C).

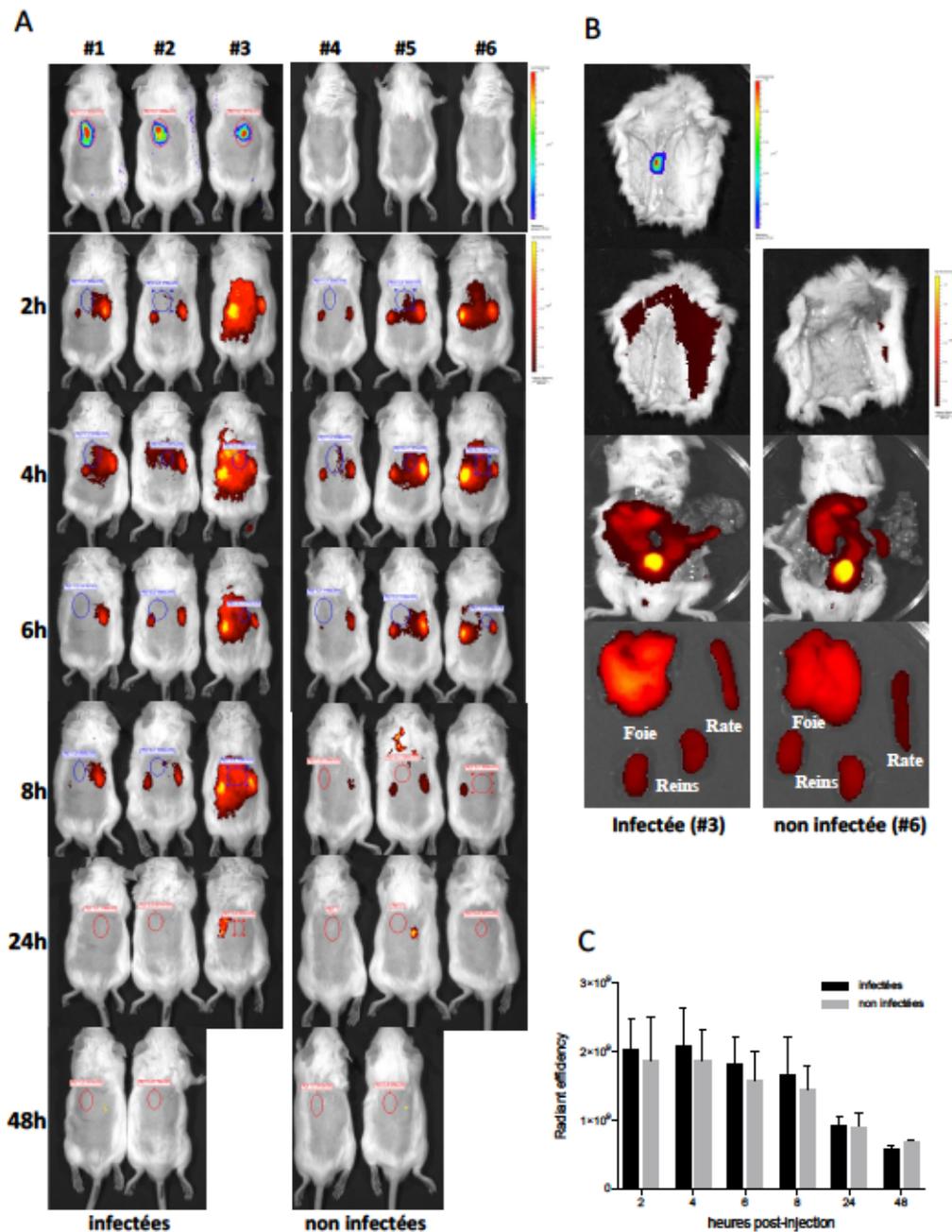
Dans une autre expérience *in vivo*, afin de contenir la majorité des parasites dans un site défini, nous avons décidé d'infecter en sous-cutanée un groupe de 3 souris (#1, #2 et #3) avec la souche CL Luc-red, 4 jours avant l'injection en i.v des VH anti-TcPRAC-IRDye 800 CW (clone « Tc »). Le site choisi pour l'infection a été la partie haute du dos afin de s'affranchir des zones correspondantes aux organes d'élimination (ex : foie, rate, reins et vessie). Un groupe témoin de 3 souris non infectées (#4, #5 et #6) a également été injecté avec la même quantité d'anticorps marqués avec l'IRDye 800 CW. La quantité injectée a été augmentée de 7,5 fois par rapport à l'expérience précédente. Les résultats sont présentés dans la figure 16.

La présence du parasite au niveau du site d'infection pour les 3 souris infectées (#1, #2 et #3) a été confirmée par l'obtention de signaux de bioluminescence dans la zone attendue (Fig. 16 A panel haut). Une cinétique des acquisitions des signaux fluorescents a été réalisée à 2h, 4h, 6h, 8h, 24h et 48h post-injection (Fig 16 A). Les régions d'intérêt (i.e. ROI) ont été dessinées autour du site d'infection pour chacune des souris infectée et « transposées » au même endroit pour le groupe de souris témoin non infecté. La moyenne des quantifications des signaux fluorescents des ROI, pour chaque acquisition et pour chaque groupe de souris (infecté et non infecté), est représentée par un histogramme exprimé en  $((\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{surface})/(\mu\text{W}/\text{cm}^2))$  (Fig. 16 C). Un pic d'émission de signal est observé à 2h et 4h post-injection, sans différence significative entre les deux groupes.

24h post-injection, la quantité moyenne des signaux a diminué de moitié (pour les deux groupes), suggérant qu'une part importante des anticorps marqués circulants « non fixés » a été éliminée. Nous avons sacrifié une souris de chaque groupe (#3 et #6) afin de procéder à

l'acquisition des signaux fluorescents sur les organes et les tissus d'intérêt *in vivo* et *ex vivo* (Fig. 16 B). Comme pour l'expérience précédente, une forte intensité de signaux fluorescents a été retrouvée au niveau de la vessie pour les 2 souris, significatif d'une élimination par voie rénale des anticorps injectés. Des signaux fluorescents ont été acquis au niveau des reins et de la rate mais également au niveau du foie des 2 souris. Concernant les biopsies de peau, nous avons visualisé de façon significative des signaux de bioluminescence pour la souris infectée correspondant à la présence des parasites au niveau du site d'infection. Par contre, nous n'avons pas pu observer d'images de co-localisation bioluminescence/fluorescence qui nous auraient permis de montrer avec une grande probabilité la fixation des anticorps V<sub>H</sub>H anti-*TcPRAC* fluorescents sur les parasites. 48h post-injection, nous avons réalisé à nouveau les acquisitions *in vivo* et *ex vivo* sur deux autres souris de chaque groupe (#2 et #5). Nous avons observé les mêmes acquisitions que celles obtenues 24h post-injection.

Cette expérience a été répétée dans les mêmes conditions en utilisant les V<sub>H</sub>H anti-*TcPRAC*-IRDye 800 CW (clones #4 et #16). Les résultats obtenus n'ont pas permis de montrer la détection des parasites via ces anticorps marqués (données non montrées).



**Figure 16 : Détection des VEH anti-TcPRAC couplés à l'IRDye 800 CW *in vivo* (II)**

Six souris Swiss mâles âgées de 7 semaines ont été utilisées. Trois souris ont été infectées par voie sous-cutanée avec  $10^4$  trypanostigotes CL Luc-red. A J4 post-infection, les trois souris infectées et les trois souris non infectées (groupe témoin) ont chacune été injectée en i.v avec  $300\mu\text{g}$  de VEH anti-TcPRAC-IRDye800CW. Le contrôle de l'infection et la détermination permettant le dessin des ROI (Regions of Interest) autour du site d'infection, ont été réalisés par les acquisitions des signaux de bioluminescence à l'IVIS Spectrum sur les trois souris infectées, préalablement injectées en i.p avec la D-Luciférine à  $100\text{mg}/\text{kg}/\text{souris}$ , avant et après l'injection des anticorps fluorescents (2h, 4h, 6h, 8h, 24h et 48h post-injection). Le dessin de chaque ROI est indiqué par un cercle rouge ou bleu (A). La quantification des signaux de fluorescence correspondant à chaque ROI, exprimée en  $(\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{surface})/(\mu\text{W}/\text{cm}^2)$ , après chaque acquisition d'une durée de 1 seconde à l'IVIS<sup>®</sup> Spectrum™ aux longueurs d'onde de 745nm/800nm (excitation/émission), a été réalisée avec le logiciel Living Image v.4.0 (Caliper, LifeSciences). Les moyennes (+/- SD) des quantifications de fluorescence des ROI du groupe « infecté » et du groupe « témoin », pour chaque session d'acquisition, sont représentées en histogramme (C). Les acquisitions des signaux de fluorescence *in vivo* et *ex vivo* sont figurées en B.

### III.5. Développement et optimisation de nouveaux inhibiteurs de la TcPRAC

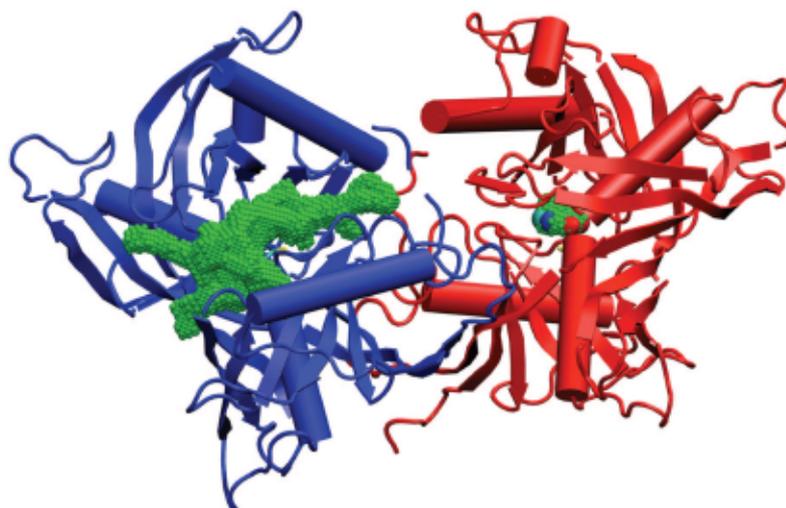
La TcPRAC, la première proline racémase eucaryote décrite, a été caractérisée au laboratoire (Reina San Martin 2000). Le gène codant pour l'enzyme est essentiel à la survie du parasite car nous avons montré que les parasites « knock-down » n'étaient pas viables. L'enzyme est également un facteur de virulence de *T. cruzi* car les parasites hyper-exprimant les gènes *TcPRAC* sont plus infectieux pour les cellules de l'hôte (Chamond et al 2005). Il y a une dizaine d'années, nous avons obtenu la structure cristallographique de la TcPRAC co-cristallisée avec un inhibiteur réversible et compétitif – le 2-pyrrolole acide carboxylique (PYC) et pu étudier le mécanisme catalytique de l'enzyme (Buschiazzo & Goytia et al 2006). Basés sur la racémisation des résidus proline L- et D-, nous avons mis en évidence le rôle clé des acides aminés cystéine présents au niveau du site catalytique de la TcPRAC. Nos données sur la diminution de la multiplication des parasites à l'intérieur des cellules en présence de PYC nous ont permis de suggérer que la TcPRAC était une cible pour le développement d'une nouvelle thérapie contre le Chagas. Des travaux multidisciplinaires ultérieurs ont permis d'avancer dans la recherche d'inhibiteurs solubles visant l'identification de nouveaux composés pouvant inhiber l'activité enzymatique.

Le PYC est un analogue plan de l'acide aminé proline (Reina San Martin et al 2000). Son caractère insoluble nous a amené à développer de nouveaux inhibiteurs pouvant être utilisés dans le cadre d'une chimiothérapie. Les premières stratégies ont utilisé la synthèse de molécules solubles à partir de la structure du PYC mais n'ont pas été concluantes (faibles inhibitions). En parallèle, la structure cristallographique de la TcPRAC a montré que la TcPRAC est un homodimère dont chaque sous-unité possède un site catalytique (Buschiazzo & Goytia et al 2006). La structure 3D de l'enzyme co-cristallisée avec le PYC a montré des conformations trop petites des sites catalytiques. Cela a été une contrainte pour l'utilisation de stratégie conventionnelle de « *drug-design* » car l'identification potentielle de nouveaux composés était restreinte à des molécules de la taille de la proline. De façon intéressante, l'obtention fortuite d'un cristal héli-saturé avec le PYC nous a permis de voir que le ligand PYC induisait une « fermeture » de la poche catalytique, et ne reflétait pas la conformation native de l'enzyme. Des analyses par dynamique moléculaire des états de transition entre l'enzyme active (forme « ouverte ») et inactive (forme « fermée ») a révélé qu'un inhibiteur de la TcPRAC n'avait pas nécessairement besoin d'induire la fermeture complète de la poche catalytique (voir Figure 17). Cette stratégie a permis de surpasser la contrainte de taille des sites catalytiques et de définir des modèles par « *docking* » virtuels et d'identifier une centaine de nouvelles molécules pouvant être des inhibiteurs de la TcPRAC (Berneman et al 2013). Deux d'entre elles, l'OxoPA et le BrOxoPA se sont avérées être des inhibiteurs irréversibles de l'enzyme capables d'inhiber *in vitro* le développement des formes intracellulaires de façon dose dépendante.

Nous avons co-cristallisé et obtenues les structures cristallographiques de la TcPRAC avec les deux inhibiteurs : l'OxoPA et le BrOxoPA. Les données ont montré que ces deux molécules formaient des liaisons covalentes avec les cystéines catalytiques (Cys300 et Cys130), par l'intermédiaire des carbones C2 et C5, expliquant de fait leur nature irréversible. La

visualisation des interactions des atomes clés au niveau du site catalytique a permis la synthèse et l'optimisation de nouvelles molécules par l'introduction de différentes substitutions et/ou additions au niveau de la chaîne carbonée. De plus, ces études nous ont permis d'identifier et de synthétiser le NG-P27 qui a montré les meilleures performances en tant qu'inhibiteur de la TcPRAC comparativement au PYC et à l'OxoPA.

Les données de structure de la TcPRAC co-cristallisée avec le NG-P27 ont permis de mieux caractériser la réaction chimique mise en cause dans la formation de la liaison covalente entre l'atome de soufre de la Cys300 du site catalytique de l'enzyme avec le carbone C2 du NG-P27. Cette réaction (ou addition) dite de Michael permet la formation d'une liaison carbone-carbone par l'addition nucléophile d'un carbanion sur un composé carbonyle  $\alpha,\beta$ -insaturé (groupements aldéhyde ou cétone par exemple). Nous avons également observé que la formation de ligand au niveau du (des) site(s) catalytique(s) affecte fortement la conformation de la TcPRAC. De plus, les six conformations de l'enzyme, obtenues par cristallographie, ont montré de fortes similarités avec les modèles prédictifs établis précédemment (Berneman et al 2013). De façon intéressante, aussi bien l'OxoPA, le BrOxoPA et le NG-P27 comme le benzimidazole inhibent de façon dose dépendante la croissance des parasites intracellulaires en condition *in vitro*. Ces travaux ont permis de démontrer que ces nouvelles approches de modélisation sont prometteuses pour la synthèse de nouvelles molécules inhibitrices malgré la restriction de taille du site actif et pourraient permettre dans le contexte de la Maladie de Chagas à la découverte de nouvelles chimiothérapies. Les résultats et les méthodologies de ces expériences sont présentés en détail dans l'article n°2.



**Figure 17 : Structure cristallographique de la TcPRAC liée ou non au PYC.**

La liaison au niveau du site actif montre un protomère « fermé » (indiqué en rouge) où le PYC (représenté en vert) est complètement enfoui dans la poche catalytique. Les sphères bleue, rouge et cyan représentent les atomes d'azote, d'oxygène et de carbone du PYC, respectivement. En l'absence de PYC, le protomère présente une structure ouverte plus relâchée (indiqué en bleu) avec un volume vacant au niveau du site actif, accessible au solvant (indiqué en vert). Extrait de l'article « Combined approaches for drug design points the way to novel proline racemase inhibitor candidates to fight Chagas' disease ». Berneman et al. PLoS One 2013.

## ARTICLE 2

### **Designed mono- and di-covalent inhibitors trap modeled functional motions for *Trypanosoma cruzi* proline racemase**

Patricia de Aguiar Amaral, Delphine Autheman, Guilherme Dias de Melo, Nicolas Gouault, Jean-François Cupif, Sophie Goyard, Patricia Dutra, Nicolas Coatnoan, Alain Cosson, Damien Monet, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Philippe Uriac, Arnaud Blondel, Paola Minoprio.

PLoS Negl Trop Dis. 2018 ; 12(10):e0006853.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853>

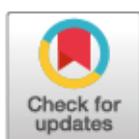
RESEARCH ARTICLE

# Designed mono- and di-covalent inhibitors trap modeled functional motions for *Trypanosoma cruzi* proline racemase in crystallography

Patricia de Aguiar Amaral<sup>1\*<sup>a</sup></sup>, Delphine Autheman<sup>2\*<sup>b</sup></sup>, Guilherme Dias de Melo<sup>2</sup>, Nicolas Gouault<sup>1</sup>, Jean-François Cupif<sup>1</sup>, Sophie Goyard<sup>2\*<sup>c</sup></sup>, Patricia Dutra<sup>2\*<sup>d</sup></sup>, Nicolas Coatnoan<sup>2</sup>, Alain Cosson<sup>2</sup>, Damien Monet<sup>3</sup>, Frederick Saul<sup>4</sup>, Ahmed Haouz<sup>4</sup>, Philippe Uriac<sup>1\*<sup>e</sup></sup>, Amaud Blondel<sup>3\*<sup>e</sup></sup>, Paola Minoprio<sup>2\*<sup>e</sup></sup>

**1** Université de Rennes 1, Equipe Chimie organique et interfaces (CORINT), UMR 6226 Sciences Chimiques de Rennes, Rennes, France, **2** Institut Pasteur, Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosomatidés, Département Infection et Epidémiologie, Paris, France, **3** Institut Pasteur, Unité de Bioinformatique Structurale, Département de Biologie Structurale et Chimie, CNRS-UMR 3528, Paris, France, **4** Institut Pasteur, Plateforme de Cristallographie, Département de Biologie Structurale et Chimie, CNRS-UMR 3528, Paris, France

<sup>a</sup> Current address: LaPlaMPPGCA, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma—SC, Brazil  
<sup>b</sup> Current address: Cell Surface Signalling Laboratory, Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, United Kingdom  
<sup>c</sup> Current address: Institut Pasteur, Centre d'Innovation et Recherche Technologique, Paris, France  
<sup>d</sup> Current address: Laboratório de Bioquímica de Protozoários e Imunofisiologia do Exercício, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil  
<sup>e</sup> Current address: Trypanosomatids Infectious Processes Laboratory, Scientific Platform Pasteur-USP, Centro d'Inovação InovaUSP, Cidade Universitária, Sao Paulo, SP, Brazil  
\* [philippe.uriac@univ-rennes1.fr](mailto:philippe.uriac@univ-rennes1.fr) (PU); [ablondel@pasteur.fr](mailto:ablondel@pasteur.fr) (AB); [paola.minoprio@pasteur.fr](mailto:paola.minoprio@pasteur.fr) (PM)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Amaral PdA, Autheman D, de Melo GD, Gouault N, Cupif J-F, Goyard S, et al. (2018) Designed mono- and di-covalent inhibitors trap modeled functional motions for *Trypanosoma cruzi* proline racemase in crystallography. PLoS Negl Trop Dis 12(10): e0006853. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853>

**Editor:** Gregory Deye, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, UNITED STATES

**Received:** May 11, 2018

**Accepted:** September 18, 2018

**Published:** October 29, 2018

**Copyright:** © 2018 Amaral et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** We thank Fondation pour la Recherche Médicale, France (FRM, project no. DCM20111223751), PTR 403 - Institut Pasteur and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-14-CE16-0001-01) for funding. PAA were supported by FRM fellowship; DA was a fellow from FRM and Institut Camot-MI. GDM was supported by ANR

## Abstract

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, affects millions of people in South America and no satisfactory therapy exists, especially for its life threatening chronic phase. We targeted the Proline Racemase of *T. cruzi*, which is present in all stages of the parasite life cycle, to discover new inhibitors against this disease. The first published crystal structures of the enzyme revealed that the catalytic site is too small to allow any relevant drug design. In previous work, to break through the chemical space afforded to virtual screening and drug design, we generated intermediate models between the open (ligand free) and closed (ligand bound) forms of the enzyme. In the present work, we co-crystallized the enzyme with the selected inhibitors and found that they were covalently bound to the catalytic cysteine residues in the active site, thus explaining why these compounds act as irreversible inhibitors. These results led us to the design of a novel, more potent specific inhibitor, NG-P27. Co-crystallization of this new inhibitor with the enzyme allowed us to confirm the predicted protein functional motions and further characterize the chemical mechanism. Hence, the catalytic Cys300 sulfur atom of the enzyme attacks the C2 carbon of the inhibitor in a coupled, regiospecific—stereospecific Michael reaction with trans-addition of a proton on the C3 carbon. Strikingly, the six different conformations of the catalytic site in the crystal

fellowship (ANR-14-CE16-0001-01) and Institut Camot-MI; PD was a fellow from CAPES, Brazil. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

structures reported in this work had key similarities to our intermediate models previously generated by inference of the protein functional motions. These crystal structures span a conformational interval covering roughly the first quarter of the opening mechanism, demonstrating the relevance of modeling approaches to break through chemical space in drug design.

### Author summary

There is an urgent need to develop innovative medicines addressing neglected diseases, multi-drug resistance and other unmet therapeutic needs. To create new drug design opportunities, we attempted to exploit protein functional motions by using a rational approach to model structural intermediates of a therapeutic target. After successfully designing inhibitors based on modeled intermediates of *T. Cruzi* proline racemase, the determination of crystal structures of the target protein in complex with the inhibitors revealed conformations that were strikingly close to the predicted models. Thus, beyond the discovery of compounds establishing a novel mode of action that can lead to innovative treatments of Chagas disease, we illustrate how modeling protein functional motions can be exploited in a rational approach to create opportunities in drug design.

### Introduction

Chagas disease, with nearly 10 million people infected and 100 million at risk, is the principal cause of lethality from neglected tropical diseases in Central and South America, and a leading one among all infectious diseases [1]. It is often fatal to young children and incurable in its chronic phase, which persists for decades and inflicts 10% annual lethality [2, 3]. In addition to its severe socioeconomic burden [1], Chagas disease is becoming a global concern as it extends to northern countries following human migrations.

There is currently no effective vaccine, and after substantial restriction in indications for the use of Nifurtimox due to severe side effects [4, 5], Benznidazole is the only generally available drug, but still causes serious side effects [6]. Drugs can be efficient in the acute phase, but are of questionable value in the chronic phase of the disease. Hence, it is considered a priority to find more effective treatments [7, 8]. Unfortunately, no satisfactory compounds have been identified so far [9] despite the identification of promising therapeutic targets [10].

Proline racemase of *Trypanosoma cruzi* (TcPRAC) is an enzyme present at all stages of the parasite life cycle, contributing to immune escape and persistence of the parasite in the host [11, 12]. Gene over-expression increases virulence, while knockdown appears lethal for *T. cruzi* [13]. Interestingly, a transition analog inhibitor of TcPRAC, 2-pyrrolicarboxylic acid (PYC), reduces *in vitro* infection in a dose-dependent manner [14] and decreases the mean number of parasites per cell [15]. These results, despite the poor solubility of PYC, supported TcPRAC as a promising target to fight Chagas disease.

Co-crystallization of TcPRAC with PYC showed highly specific and tightly closed catalytic sites of the enzyme (pdb 1W61), which left almost no space for modulation of inhibitor candidates [16]. Accordingly, conventional drug design strategies based on this structure proved unsuccessful. The structure also showed that TcPRAC crystallizes as a homodimer and bears a catalytic site on each subunit. Interestingly, a crystal of a hemi-saturated form (pdb 1W62) showed the free subunit catalytic site in an open form. This suggested that the enzyme function

involved an opening/closing mechanism with intermediate forms that could be used to identify and design novel types of inhibitors. To test this hypothesis, we modeled plausible intermediates of the functional opening/closing motions of TcPRAC [17]. This strategy allowed an expansion of the chemical space used in our virtual screening procedure and led us to identify two inhibitors of the enzyme, (E)-4-Oxo-pent-2-enoic acid (OxoPA) [18] and its derivative (E)-5-Bromo-4-oxo-pent-2-enoic acid (BrOxoPA) which were far more potent than PYC [17].

Although conventional strategies in drug design focus on competitive inhibitors, the identification of covalent inhibitors is fortunate considering the growing interest in this type of enzymatic inhibitors [19, 20]. Indeed, a number of previously known anti-infectious agents ( $\beta$ -lactams, antivirals) [21, 22] or more recently the proton pump inhibitors [23], are irreversible inhibitors that have been successfully used for therapeutic purposes. This strategy was used by Ellmann and colleagues to design cruzipaine inhibitors for *T. cruzi* [24, 25]. Optimization of irreversible inhibitors requires the development of advanced and specific methods taking pre- and post-reaction states into account in the design of chemical chemical analogues aiming at therapeutic use [23].

Resolution of the OxoPA and BrOxoPA co-complexes in this work turned out to be a key step in the design of improved drug candidates, since it showed their detailed atomic interactions in the catalytic site and identified atoms involved in covalent bond formation. This enabled us to model the candidate structures and their interactions with the enzyme both before and after the reaction, allowing the induced changes in chemical connectivity and geometry to be taken into account in the design process. Accordingly, we could probe the determinants for affinity and selectivity by modulation of the electrophilic moieties of design candidates taking into account the position of the nucleophilic catalytic cysteine. The designed candidate displaying the best TcPRAC enzymatic inhibition, NG-P27, exhibited trypanostatic/trypanocidal activity in preliminary *in vitro* experiments. The crystal structure of NG-P27 in complex with the enzyme revealed the position of the inhibitor after reaction along a regio-specific and stereospecific Michael mechanism. The structure also revealed that the cyclopentane moiety of the inhibitor could adopt multiple conformations, suggesting that space was available for further chemical modulations. Interestingly, the conformation of the active site in the co-crystal structures with our inhibitors was highly similar to that of the transitional intermediate models built to identify the first inhibitors by virtual screening [17]. This could be viewed as a demonstration of the relevance of molecular modeling in enlarging chemical space search in drug design.

## Methods

### Preparation of recombinant TcPRAC

Recombinant *Trypanosoma cruzi* proline racemase (EC 5.1.1.4) was produced in *E. coli* BL21 (DE3) (Invitrogen) and purified by immobilized metal affinity chromatography on nickel columns, as previously described [11].

### Racemization of L-Proline and inhibition assays

Proline racemization conditions for TcPRAC were determined as previously described [12] and L- to D- proline conversion took place in 1.0 mL reaction. The concentrations of D-proline were determined by optical rotation of the solution at 365 nm with a 10 cm optical path cell, at 37°C for 10<sup>3</sup> seconds using a polarimeter (Jasco, P-2000, Bouguenais, France). Assays were performed as follows: 40 mM of L-Proline in 0.2 M sodium acetate pH 6.0 and 5  $\mu$ g/mL of TcPRAC were loaded into tubes with serial dilutions of PYC, OxoPA and BrOxoPA (from 0.3125 to 5  $\mu$ M), or similar concentrations of potential optimized inhibitors.

### Kinetics analysis

Inactivation kinetics were performed at different inhibitor concentrations as described previously [17, 26, 27]. A program developed in-house was used to fit the data [17, 26, 27]. As global fitting appeared difficult and was unsuccessful, single exponential models were simply fit to the individual kinetics. Each fit was checked visually.

### Crystallization, X-ray data collection, processing, and refinement

Crystallization screening trials for TcPRAC in complex with the compounds BrOxoPA, OxoPA, and NG-P27 were carried out by the sitting drop vapor-diffusion method with a Mosquito automated nanoliter dispensing system (TTP Labtech, Melbourn, UK). Sitting drops of 400 nL were set up in Greiner plates for 672 commercially available screening solutions with a 1:1 mixture of protein complex at 10mg/mL equilibrated against 150  $\mu$ L of reservoir solution. The plates were stored at 18°C in a RockImager (Formulatrix, Bedford, USA) automated imaging system to monitor crystal growth. Best crystals of TcPRAC in complex with the inhibitors in 1 mM solutions were obtained with a solution of 0.2 M potassium phosphate dibasic and 21% (w/v) PEG-3350. Crystals with dimensions of up to 0.1 mm x 0.1 mm x 0.05 mm appeared within one week. For data collection, the crystals were flash-cooled in liquid nitrogen using a paratone-paraffin oil mixture (50%/50%) as cryoprotectant.

X-ray diffraction data were collected on beamline PROXIMA-1 at synchrotron SOLEIL (St Aubin, France). Diffraction images were integrated with the program XDS [28–32] and crystallographic calculations were carried out with programs from the CCP4 program suite [28–32]. The structures were solved by molecular replacement using Phaser [28–32] with TcPRAC in complex with PYC (pdb 1W61) [16] as a template. Refinement was done using Refmac5 [28–32] with alternating manual rebuilding in Coot [28–32]. Crystallographic data and refinement statistics are shown in Table 1.

### PDB deposition

The refined models and structure factors have been deposited in the Research Collaboratory for Structural Biology Protein Data Bank (hyperlink "<http://www.rcsb.org/>") under the following accession numbers: TcPRAC-BrOxoPA (6HJF), TcPRAC-OxoPA (6HJG), TcPRAC-NG-P27 (6HJE).

### Synthesis

Description of the synthesis of TcPRAC inhibitors is given in "General Information on Chemical Synthesis" (S1 Text), "Synthetic procedures" (S2 Text) and Refs. [33–35]. The spectral characterization of the compounds is given in the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra" (S1 Spectra).

### Conformational analysis

For conformational analysis, the atomic coordinates of the TcPRAC structures were limited to residues 45–394 for which the electron density could be traced in all structures. Amino acids (K152, E178, R210, P280, E281, Y294), whose side chains were not visible in all the structures, were replaced by alanine. Symmetric structures were generated by swapping the chain names (e.g. A to B and B to A) before alignment. The crystal structures, the 49 models [17], and their symmetric forms were structurally aligned by rotation and translation minimizing the root mean square distances for each set of atoms subjected to Principal Component Analysis (PCA). These sets were, respectively, the dimers, the protomers, and the amino-acids (E56, F102, L127, N128, M129, C130, G131, H132, G217, N218, F220, D269, C270, V288, F290,

Table 1. Crystallographic parameters, data and refinement statistics.

	TcPRAC-BrOxoPA	TcPRAC-OxoPA	TcPRAC-NG-P27
<b>Crystal parameters</b>			
Space group	c2	c2	c2
Unit cell dimensions (Å)	a = 129.66, b = 90.84	a = 129.24, b = 91.33,	a = 133.23, b = 90.64,
	c = 85.92, β = 126.29°	c = 85.63, β = 126.45°	c = 85.39, β = 126.04°
<b>Data statistics</b>			
Resolution limits (Å)	42.7–1.70 (1.73–1.70)*	42.66–1.90 (1.94–1.90)	45.3–2.00 (2.05–2.00)*
No. of unique reflections	86740 (4332)	61363 (4017)	54731 (3986)
Multiplicity	3.8 (3.5)	2.6 (2.6)	3.8 (3.8)
Rmerge	0.052 (0.675)	0.077 (0.599)	0.084 (0.758)
Rpim	0.037 (0.496)	0.060 (0.480)	0.058 (0.497)
Completeness (%)	98.5 (95.8)	97.6 (99.4)	98.8 (98.0)
<I/σ(I)>	12.0 (1.7)	8.2 (1.9)	7.8 (1.7)
CC(1/2)	0.998 (0.695)	0.995 (0.645)	0.994 (0.761)
<b>Refinement</b>			
Resolution (Å)	41.4–1.70 (1.72–1.70)	41.2–1.90 (1.92–1.90)	45.4–2.00 (2.025–2.00)
. R value, working set	0.171 (0.328)	0.189 (0.290)	0.177 (0.254)
. Rfree	0.203 (0.425)	0.240 (0.388)	0.230 (0.331)
No. of reflections	84997 (3050)	59988 (2116)	52236 (993)
. Non-hydrogen atoms	5971	5939	5886
. No. of protein residues	709	728	713
. No. of water molecules	540	361	403
. PO <sub>4</sub> ions	-	1	1
R.m.s. deviations from ideal			
. bond length (Å)	0.010	0.011	0.010
. bond angles (°)	1.401	1.487	1.460
Ramachandran plot (%)			
. Preferred regions	96.0	96.4	95.6
. Allowed regions	3.7	3.1	3.7
. Outliers	0.3	0.6	0.7

\*Values in parentheses are for the highest resolution shell

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.t001>

G291, D296, S298, C300, G301, T302, G303) defining the pocket used for virtual screening in the previous study [17].

In the description of the analysis, the protomers from the crystal structures are named according to the following scheme: *Code-C*, or *Lig-C*, with *Code*, the PDB code, and *Lig*, OxoPA or NG-P27, the ligand present in the structure, and *C* the chain, A or B of the protein. The protomers from the transitional models are designated: *confNC*, with *N*, the index of the model intermediate in the transitional series, and *C*, the chain name as indicated above.

### Calculation of pocket cavity volume

We used an in-house program to calculate cavity volumes in the pockets on a grid of voxels [36, 37]. Settings and parameters were similar to those previously reported [17], but further refinements were incorporated to delineate cavities opened to the bulk solvent. The latter was scooped out with a large rolling probe sphere of 10 Å radius with an extra erosion shell of 3.3 Å to remove the exposed part of the cavity. To discriminate the volume of the channel induced

by opening from the volume delineated by the binding pocket, only cavity voxels that had one of the residues of the pocket as closest neighbor were counted.

### Parasite cultures

Epimastigote forms of CL Brener (clone F11-F5) and Y strains of *Trypanosoma cruzi* [38] constitutively expressing luciferase were maintained by weekly passage in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium. Stock solutions (1M) of Benznidazole and NG-P27 were prepared in DMSO and subsequently diluted in LIT medium. Trypanosomal growth inhibition was determined by the evaluation of parasite number after 72h in triplicates.  $10^5$  epimastigotes cultured in white microtiter plates in absence or presence of 5–1000  $\mu$ M of NG-P27 were compared to results obtained with the same concentrations of Benznidazole (added once, or every day for three days) in a final volume of 200  $\mu$ L. Luminescence signals emitted by live parasites in the microplate wells were quantified by the addition of 0.3 mg/mL D-luciferin (122799, Perkin Elmer, Villebon-sur-Yvette, France) in a TECAN luminometer (Infinity F200 Pro, Lyon, France). IC 50 was determined by using a non-linear fitting of the percentage of inhibition calculated after comparison to untreated controls.

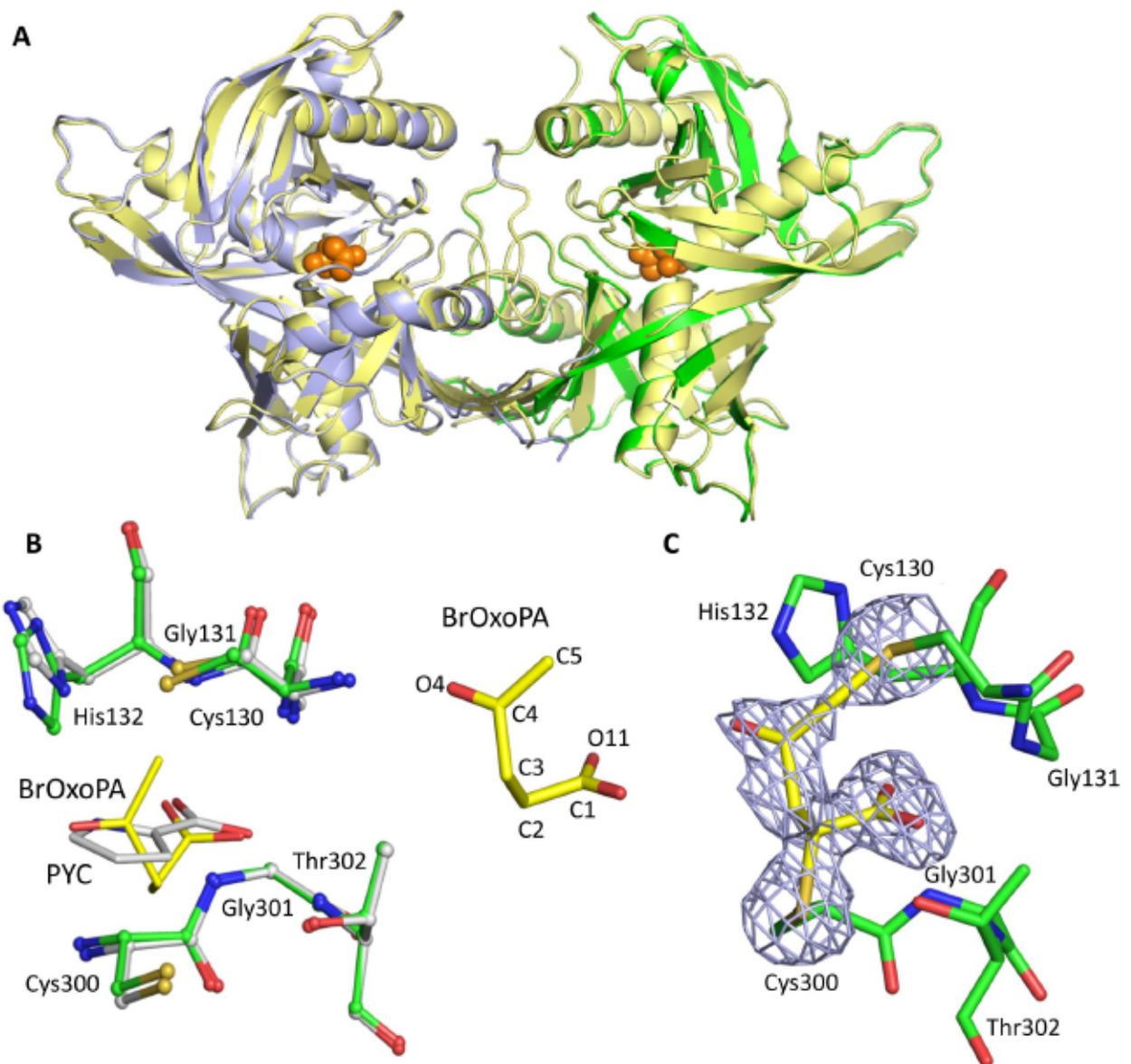
## Results

### Structures of TcPRAC-BrOxoPA and TcPRAC-OxoPA complexes

BrOxoPA and OxoPA were co-crystallized with the enzyme. The crystallographic data and refinement statistics are shown in Table 1. The complexes crystallized in the same space group and with similar unit cell dimensions as the TcPRAC/PYC complex structure reported previously (pdb 1W61) [16]. The crystallographic asymmetric unit contains two independent polypeptide chains (A, B) forming a homodimer.

In the TcPRAC-OxoPA complex, continuous electron density was seen for residues 40–394 in chain A and 45 to 398 in chain B. The overall structure closely resembles that of the enzyme in complex with PYC (1W61; Fig 1A), with an overall RMS deviation in alpha carbon positions of 0.227 Å. The position and orientation of the side chains of residues in the active site region are similar in both structures (Fig 1B). Significant electron density for the inhibitor was observed in the active site of both chains (Fig 1C). Atoms C2 and C5 of BrOxoPA are covalently bound to the sulfur atoms of Cys300 and Cys130, respectively (Fig 1C, S1 Table). These covalent interactions can explain the irreversible inhibition of TcPRAC by BrOxoPA. The carboxylate moiety of the inhibitor also forms a hydrogen-bonding network with the main polypeptide chain or side chains of Gly131, His132, Gly301, and Thr302 in the active site region (Fig 1C, S1 Table). These residues are also involved in the non-covalent binding of the PYC inhibitor as previously described [16]. No electron density was observed for the bromine atom of the BrOxoPA inhibitor in difference Fourier maps, and X-ray fluorescence scans indicate the absence of bromine in crystals of the complex, suggesting that the bromine atom of the inhibitor was cleaved during the binding reaction of BrOxoPA with the enzyme.

The TcPRAC-OxoPA structure presented similar global characteristics. However, comparison with the other structures is less straightforward due to greater dissymmetry between the two monomers. The impact of ligand binding on TcPRAC conformation is described below and a more comprehensive analysis is provided in S3 Text. In both monomers, well defined electron density is seen for the carboxylic moieties as for BrOxoPA and PYC, but the absence of well-defined density for the ketone moiety in the OxoPA complex suggests that this part of the ligand had more relaxation freedom, and covalent interaction was not observed. These observations were confirmed by pharmacomodulations performed to optimize chemically OxoPA and BrOxoPA (see below).



**Fig 1. Comparison of the TcPRAC structures in complex with BrOxoPA and PYC.** (A) Superimposed TcPRAC structures: the complex with PYC (yellow); TcPRAC monomers in complex with BrOxoPA (green and light blue) and BrOxoPA (shown as orange spheres). (B) Superposition of the ligands and key residues of the catalytic site. BrOxoPA is shown in yellow and PYC in gray (C) 2Fo-Fc electron density omitmap contoured at 3σ of BrOxoPA after reaction, showing the covalent bonds to Cys130 and Cys300. Atom numbering is displayed on the left.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g001>

### Modulations to identify novel potent and specific TcPRAC covalent inhibitors

Analysis of X-ray crystallographic data of the TcPRAC/BrOxoPA complex revealed two covalent bonds with the catalytic cysteine residues of TcPRAC. This confirmed the high potential of the ligand and prompted us to probe the available chemical space to design a more specific

covalent inhibitor. Hence, the nature of the Michael acceptor was modified and substituents were introduced at different positions of the skeleton (Fig 2).

About 60 compounds were synthesized following these principles and their ability to inhibit TcPRAC was evaluated by polarimetric assay. Compounds 1 to 6 are key examples of the pharmacomodulations (Fig 2A). Their respective activities on TcPRAC (Fig 2B) are compared with those of OxoPA and BrOxoPA (Fig 2C). Replacement of the ketone group with the highly electroattractive sulfoxide (1) or a sulfone (2), commonly used to design Michael acceptors [39], abolished inhibition. Differences in spatial arrangement and geometry of the tetrahedral sp<sup>3</sup> sulfoxide/sulfone as compared to the trigonal sp<sup>2</sup> ketone could explain this unforeseen result. Introduction of a triple bond (3) instead of the classical double bond Michael acceptor also abolished inhibition. Further modulations were performed on the skeleton to probe possible extension/modulation sites. Addition on the electrophilic site, C-2, (4) close to the Cys300 attack position, prevented inhibition. By contrast, additions at positions C-3 (5, 6), C3 and C5 (7) or C-5 only (8, 9) moderately affected or maintained inhibition (Fig 2D et 2E). Compound 6 (NG-P27), bearing a five-membered ring (reminiscent of proline) was the most active derivative.

### Kinetics of TcPRAC activity in the presence of inhibitors

Inhibition kinetics were recorded at various concentrations of PYC, OxoPA and NG-P27 (Fig 3). The kinetic curves in the absence of inhibitor were linear, validating the initial velocity approximation. Except for PYC, the asymptotes of the single exponential fit model depended on the inhibitor concentration and differed from the zero rotatory power line. Hence, the enzyme appeared to reach full inactivation during the reaction. This is typical of an irreversible inhibition mechanism and rules out a reversible competitive inhibition mechanism.

The apparent exponential kinetics constant ( $k_{obs}$ ) varied linearly with the concentration of OxoPA and NG-P27 as expected for an irreversible inhibition mechanism (Fig 3, inset). These results indicate that NG-P27 is a significantly more potent inhibitor than OxoPA. By contrast, the  $k_{obs}$  values were nearly zero for PYC, a reversible competitive inhibitor.

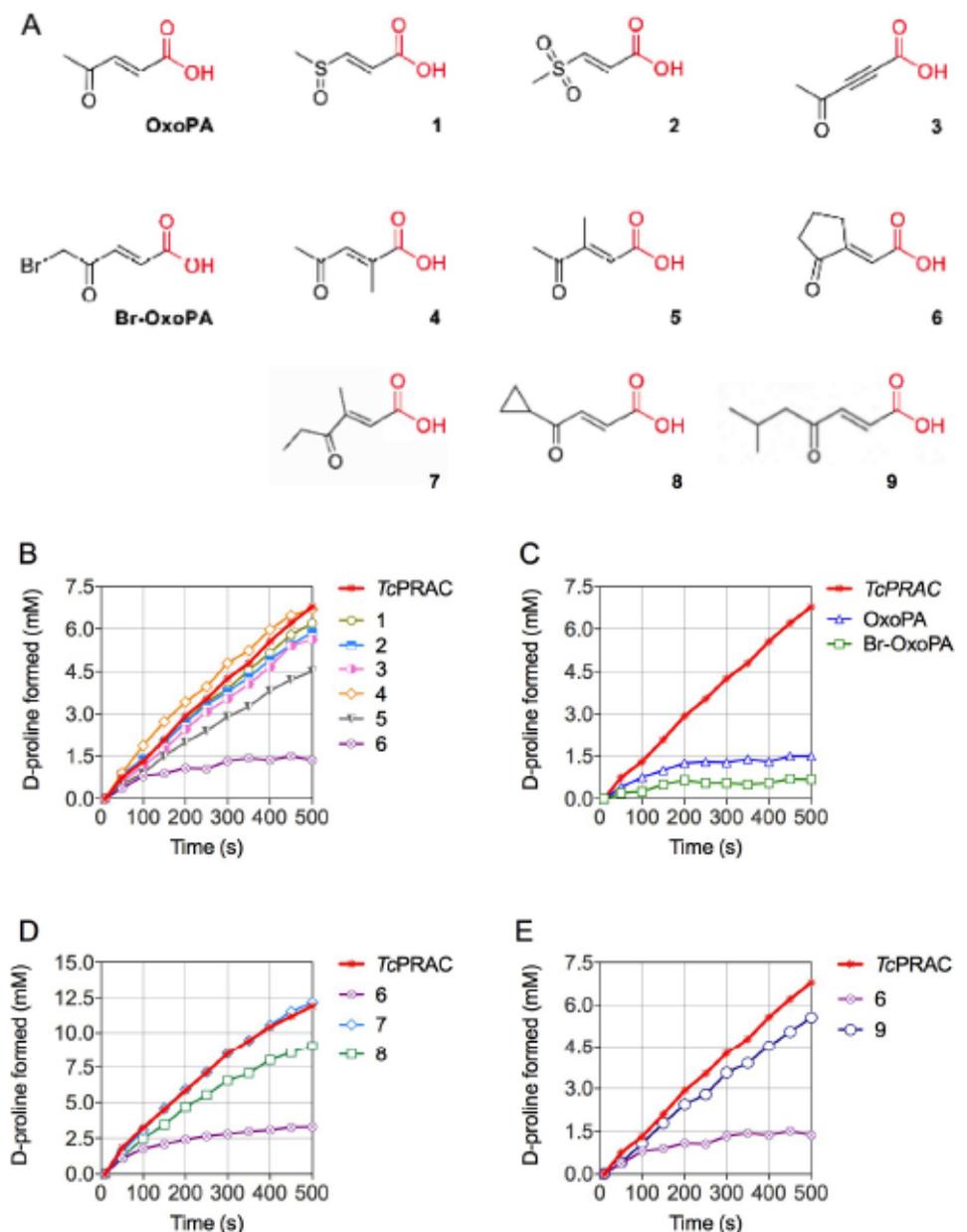
### Structural characterization of NG-P27 in the active site of TcPRAC

The NG-P27 compound was co-crystallized with TcPRAC in the same conditions as the BrOxoPA complex (Table 1). The overall structure of the TcPRAC/NG-P27 complex and the conformation of residues in the active site displayed some deviation to the TcPRAC/BrOxoPA, TcPRAC/OxoPA and TcPRAC/PYC complexes, but remained globally similar.

Continuous electron density was observed from residues 38–394 in chain A and 43 to 398 in chain B. Difference Fourier electron density maps indicate the presence of the inhibitor NG-P27 covalently bound to Cys300 in the active site of both polypeptide chains in the dimer. Electron density maps suggested possible multiple conformations of the cyclopentanone moiety of the inhibitor, but no attempt was made to refine alternative conformers and we describe here a single conformation of the ligand that best fits the electron density (Fig 4). The C2 atom of NG-P27 is covalently linked to the sulfur S<sub>γ</sub> atom of the catalytic Cys300 (Fig 4, S2 Table). In both monomers the inhibitor is very tightly packed, making numerous van der Waals contacts in the active site, and a hydrogen-bonding network stabilizes the carboxylate moiety of NG-P27 as observed for the TcPRAC/BrOxoPA complex (Fig 4B and S2 Table).

### Impact of ligand binding on TcPRAC conformation

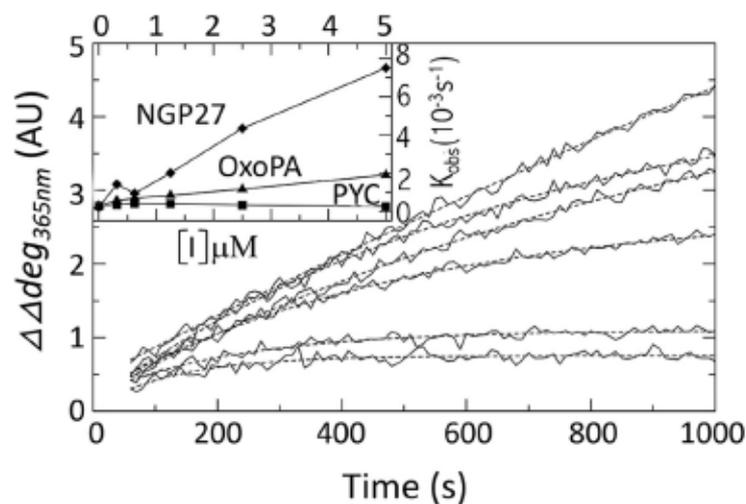
Ligand binding strongly affects the conformation of the protomers. For example, the two protomers of the hemi-saturated PYC-TcPRAC complex (pdb: 1W62) deviate by 2.25 Å RMS on



**Fig 2. Chemical structures and activity of potential TcPRAC inhibitors.** (A) Key compounds obtained by modulation of OxoPA and BrOxoPA. (B, C, E) Kinetic curves of 40 mM L-proline racemization catalyzed by 15 µg of TcPRAC in the presence of 5 µM of compounds 1 to 6 or 9 (B and E) or in the presence of 5 µM of OxoPA and BrOxoPA (C); Kinetic curves using 100 mM L-proline racemization catalyzed by 10 µg of TcPRAC in the presence of 10 µM of compounds 7 or 8 (D).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g002>

C $\alpha$  positions after alignment. To gain a more comprehensive understanding of the relative motions in all the structures (5 crystal dimers, and 49 intermediate dimer models) we used Principal Component Analysis (see [S3 Text](#) for details).



**Fig 3. Inhibition kinetics.** Main panel: Racemisation curves of 40mM of L-Proline in the presence of 5  $\mu\text{g}$  of TcPRAC and 0.0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5 and 5  $\mu\text{M}$  of NG-P27 inhibitor are reported by continuous lines from top to bottom respectively. Single exponential fits are given by underlining dashed curves. Inset: Rates of the exponential fits are given for NG-P27 (diamonds), OxoPA (triangles), and PYC (squares). Xmgrace was used to generate the graphics [<http://plasma-gate.weizmann.ac.il>].

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g003>

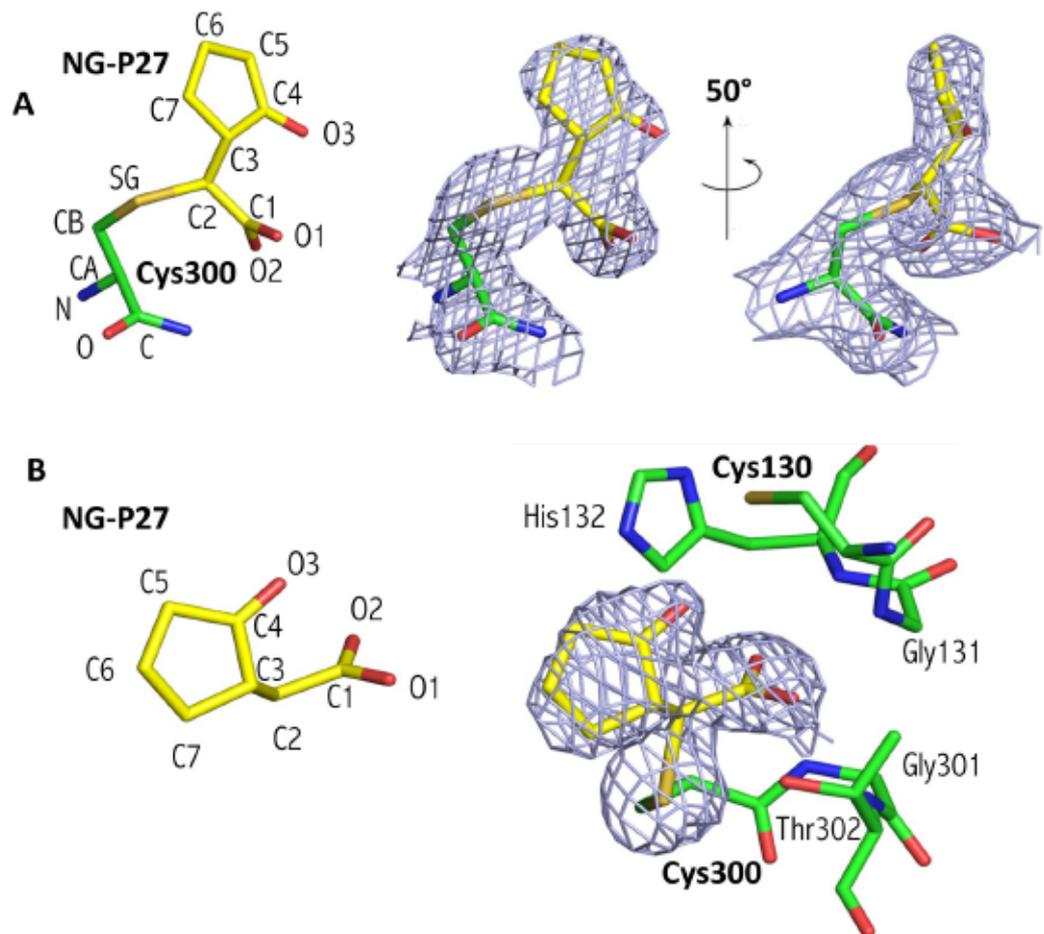
## Dimers

The dimers and their symmetric forms (chains A and B swapped) roughly projected as a triangle on their first two Principal Components (Fig 5A). The saturated closed forms (1W61 and BrOxoPA) marked the top vertex. The hemisaturated 1W62 and its symmetric form constituted the base of the triangle, approximately followed by the transition models. Interestingly, OxoPA and NG-P27 displayed structures roughly midway between 1W61 and 1W62 in their direct and symmetrized forms, respectively.

**Protomers.** Analysis performed on the oriented protomers yielded projections that were globally aligned (Fig 5B). The transition models of chains A and B followed different paths. Interestingly, OxoPA-B (see naming schemes in Materials and Methods) and both chains for NG-P27 adopted intermediate conformations. Their B chains were closest to the model conformation 4 of chain A (conf4A), which led to the identification of BrOxoPA and OxoPA [17].

**Binding site.** In the analysis of the binding site, used for the virtual screening [17], the closed conformations were tightly clustered (Fig 5C). Strikingly, projections for conf1A, conf4A, and conf10A were closely aligned with those of both NG-P27-A and NG-P27-B and OxoPA-B (OxoPA-B—conf4A: 0.98 Å; NG-P27-A—conf2A: 0.82 Å (0.90 Å of conf4A); NG-P27-B—conf5A: 1.16 Å (1.17 Å of conf4A)). Projections of the two B chains were almost midway between those of models conf4A and conf10A. Fig 6 compares the structures of the binding site for intermediates along the transitional model with those of the TcPRAC crystal structures when binding ligands of increasing size. PCA showed that the conformational changes observed by crystallography were globally well anticipated in the models (Fig 5C). Nonetheless some local traits were found either in the "early" model, conf4A (e.g. residues N218 or C130; Fig 6A), or in the "later" model (conf10A; e.g. residue F290, labeled backbone traces).

Analysis of the volumes delineated by the binding site (Table 2) gave similar conclusions and further usage perspectives. The complex with BrOxoPA, which formed two bonds within each site, displayed the smallest volumes. Sites in OxoPA-A and NG-P27-A had similar



**Fig 4. Structure of NG-P27 after reaction in the TcPRAC binding site.** (A) Left, ligand atom numbering of NG-P27 bound with the catalytic Cys300, oxygen atoms are shown in red, nitrogen in blue, and carbon in yellow for NG-P27 and green for the Cys300; Right, two views of NG-P27 bound to Cys300 with a difference electron density omitmap contoured at  $3\sigma$ . (B) Orientation of the inhibitor and key residues in the catalytic site. The electron density map is calculated as in (A).

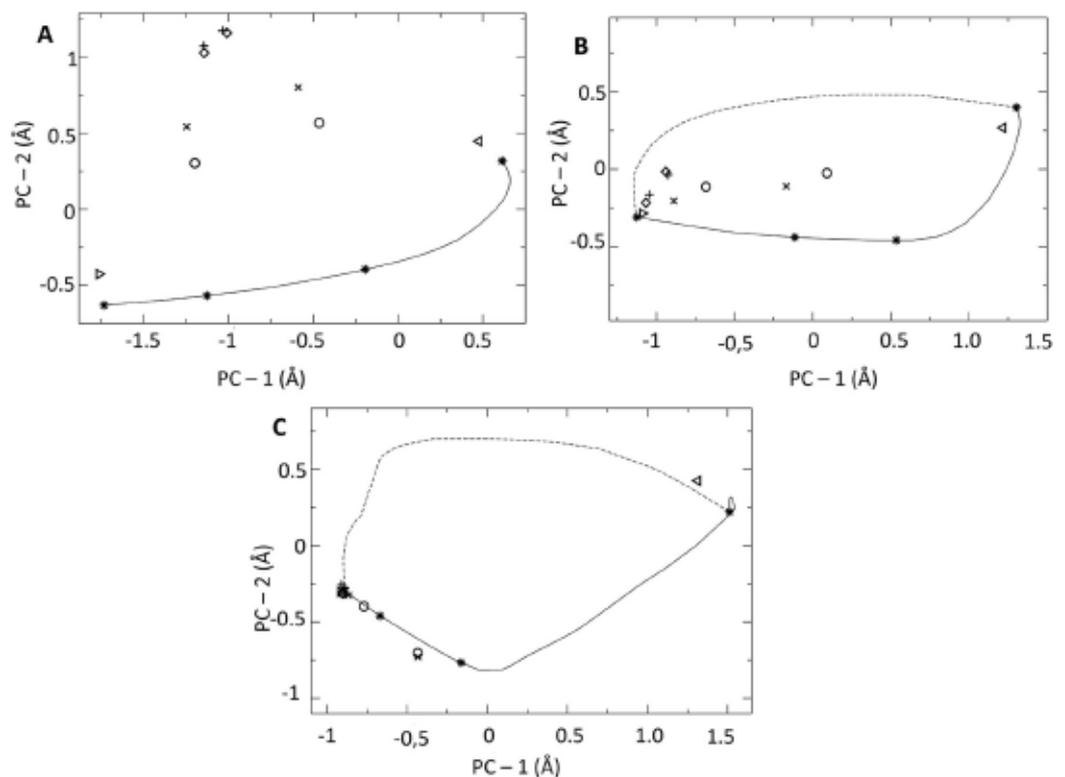
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g004>

volumes to those found with PYC in 1W61-A/B and 1W62-A. Interestingly, in B chains, the binding sites were enlarged and had partial access to the solvent, with volumes similar to those of conf4A and conf10A of the transitional model.

In the ligand-bound forms, residues 130–132 are folded to form up to three hydrogen bonds with the ligand carboxylate moiety Cys130 positioned for nucleophilic attack. In the apo form, 1W62-B (and conf49A), this segment adopts a radically different fold. Despite the fairly open conformation of the OxoPA-B and NG-P27-B complexes, this region is well folded for interaction with the ligand (Fig 6). This difference, not apparent from the volumes (Table 2), is reflected by the difference between the two branches of the transition model in the binding pocket (Fig 5C).

### Reactivity of inhibitors probed on cysteine proteases

One concern with Michael acceptors is their general reactivity, especially towards enzymes with reactive cysteines [40] and thus their lack of specificity. Hence, we tested the reactivity of



**Fig 5.** Projections on the first two Principal Components (PCs), (A) of the whole dimers coordinates and symmetric forms, (B) of chains A or B isolated, and, (C) of the binding pocket of chain A or B. Triangles pointing right/left mark 1W61/its-symmetric or chain A/B. Diamonds mark 1W61; "+", BrOxoPA complex; "x", OxoPA; and "o", NG-P27, respectively. The 49 transition path intermediates are connected by lines and conformations 1, 4, 10 and 49 used for the virtual screening are shown by "\*". The 49 intermediates of chain B are connected by dashed lines.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g005>

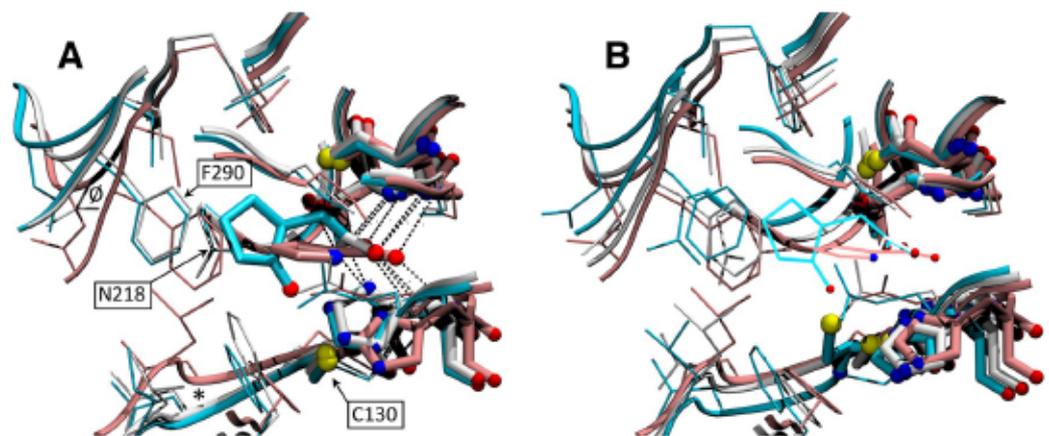
our inhibitors towards cysteine proteases. As shown in Fig 7, the compounds did not inhibit papain or bromelain.

### Effect of NG-P27 TcPRAC specific inhibitor on *T. cruzi* parasites

Unlike OxoPA and BrOxoPA, NG-P27 displayed effects on parasite cultures. These effects were determined after 72h on cultures for two parasite populations and compared with the effect of Benznidazole (Fig 8). Both compounds exhibited dose-dependent trypanocidal activity for the CL and Y parasite strains. However, while multiple additions (three times) of Benznidazole increased parasite growth inhibition, no particular cumulative effect was observed after single or multiple treatments with NG-P27.

### Discussion

The search for an effective inhibitor of TcPRAC was fostered by the use of structural intermediates generated between the open and closed forms of the enzyme [41]. This procedure allowed us to overcome a dead-end in the design strategy based on the PYC co-crystal structures [16], where the volume of the catalytic site was too small for a suitable chemical space search for improved inhibitors. The identification of the OxoPA and BrOxoPA inhibitors validated this method [17].



**Fig 6.** Close views of the binding sites showing conformational changes for (A) the crystal co-complexes with PYC (1W62-A, pink), OxoPA (chain B, white), and NG-P27 (chain B, cyan), and for (B) for transitional model intermediates, conf1A (pink), conf4A (white) and conf10A (cyan). Main chains are presented by ribbons, sidechains, thin sticks for amino acids of the binding site (see list in [Materials and Methods](#)). Catalytic cysteines, the ligand and residues making hydrogen bonds (dashed lines) with the ligand carboxylic moiety (C130, G131, H132, C300, G301, T302) are displayed in bolder sticks, and non carbon atoms as blue, red, and yellow spheres for nitrogen, oxygen and sulfur, respectively. The crystallographic ligands are also represented with lines in the transitional models for reference. Amino acids C130, N218, F290 are labeled, and regions 127–130 and 289–291 of the backbone are labeled with \* and Ø signs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g006>

To better explore the chemical space that could be used in pharmaco-modulation, we solved the co-crystal structure of TcPRAC with the OxoPA and BrOxoPA inhibitors. Structural analysis of the binding mode of the inhibitors and the induced conformational changes of the enzyme allowed us to pursue the chemical design by taking into account the chemical mechanism and protein environment both before and after reaction. This strategy led us to identify NG-P27 as a potent inhibitor of TcPRAC, a key enzyme for parasite development and fate. This inhibitor could also be co-crystallized with TcPRAC, revealing further details of the reaction mechanism. NG-P27 thus appeared as a promising starting point for further optimization in the search for more effective therapies against Chagas disease.

### Inhibition mechanism of TcPRAC

**Inhibitor reactive sites and design.** In the BrOxoPA and NG-P27 complexes, the C2 carbon atom of the inhibitor is located approximately 2 Å from the catalytic Cys300 Sγ atom in

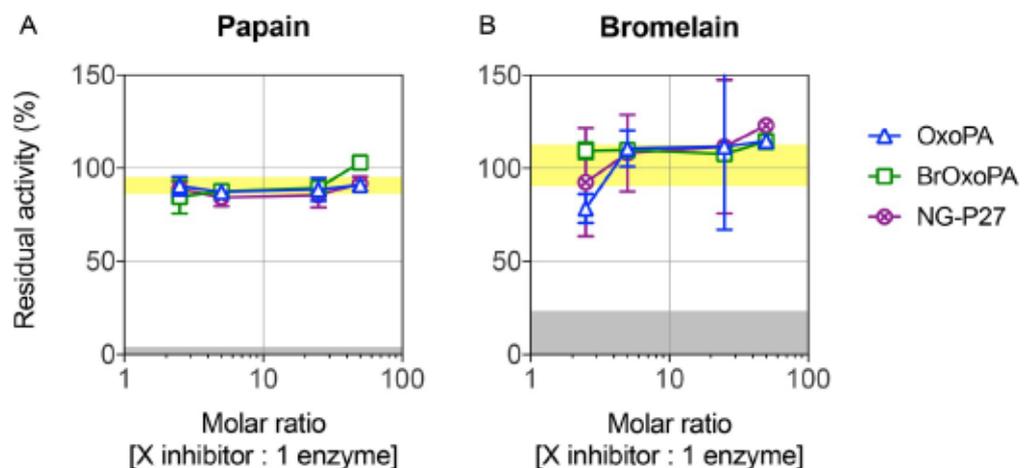
**Table 2. Volume of the binding site cavities.**

<sup>a</sup> Volume	1W61	1W62	BrOxoPA	OxoPA	NG-P27
Chain A	73.1	72.4	57.3	69.4	81.0
Chain B	73.5	12.9 (763.4)	63.0	118.3 (330.9)	126.1 (377.6)
<sup>b</sup> Transition		conf1A	conf4A	conf10A	conf9A
		70.9	87.4	123.1	96.6 (864.8)

<sup>a</sup>The volumes delineated by the catalytic pocket only (amino-acids used in the screening) are calculated with a suite of programs developed by Desdouts et al. [36, 37] as explained in Materials and Methods and given in Å<sup>3</sup>. When pockets are accessible from the bulk solvent through a channel, the sum of its volume with that of the channel are given in brackets below.

<sup>b</sup>The pocket structures used for the virtual screening were all from chain A of the model.

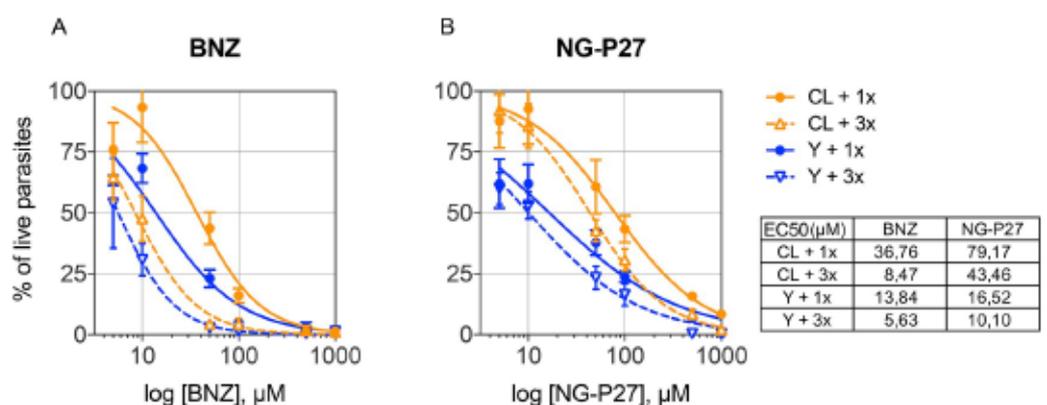
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.t002>



**Fig 7. Activity of potential TcPRAC inhibitors with cysteine proteases.** Residual activity (%) of papain (A) and bromelain (B) after incubation with different stoichiometric ratios of OxoPA, Br-OxoPA and NG-P27. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Residual activities after incubation with the E-64 cysteine protease inhibitor (gray hatched area) or with DMSO (light-yellow area) are shown.

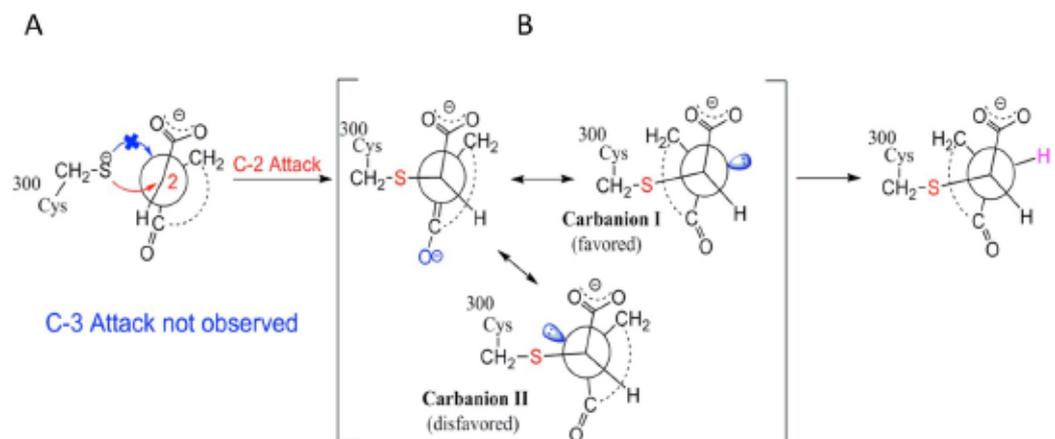
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g007>

the active site, showing the formation of a thio-ester bond (S1 and S2 Tables). The formation of a covalent bond is also implied by kinetic data for all inhibitors including OxoPA (although not observed in the crystal structure of the TcPrac/OxoPA complex). Interestingly, C2 is at a position similar to that of the C $\alpha$  carbon of proline, the natural substrate of the enzyme, and is at the center of a tight, highly specific network of interactions in the active site. Accordingly, this motif appeared essential in our design, as exemplified by NG-P27, and should be important for efficacy and selectivity in the future design of improved inhibitors. In the TcPRAC/BrOxoPA complex, a bond is formed between Cys130 and the C5 atom of the inhibitor, as revealed in the crystal structure, and is further supported by bromine atom departure as revealed by X-ray fluorescence measurements. Indeed, alpha-bromoketones, as found in BrOxoPA, are known to be highly reactive [39]. This reactivity could result in reduced stability



**Fig 8. Determination of IC<sub>50</sub> for epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*.** Trypanocidal/trypaostatic effect after 72h of incubation of bioluminescent parasites of CL and Y strains with different concentrations of the reference drug benznidazole (BNZ; A) and the NG-P27 TcPRAC inhibitor (B) added once (1x, complete lines) or three times, once a day for three days (3x, dashed lines).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g008>



**Fig 9.** Proposed mechanism explaining (A) regioselectivity and (B) stereoselectivity in the inhibition of TcPRAC by oxopentenoic derivatives

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g009>

in biological media and lack of specificity leading to increased toxicity, both major disadvantages for drug design.

Cross-linkage has been previously reported [42] for alkylating agents such as chlorambucil, forming two bonds with its target. Furthermore, examples of double-linkage in an enzymatic catalytic site involving two of the catalytic residues have been reported with coumarine and iso-coumarine derivatives [43, 44]. Despite the promising potential of this feature, use of the alpha-bromoketones would have required important efforts to decrease its reactivity, and design in that direction was not pursued.

**Regioselective attack at the C2 carbon of the inhibitor.** The carbon atoms in the C2 = C3 double bond of OxoPA and its derivatives bear carboxylate and ketone substituents respectively, allowing reaction at either position [45] (Fig 9A). Nonetheless, as revealed in the crystal structures, the reaction was regiospecific for the C2 carbon acting as a Michael acceptor, as often observed for cysteine enzymes [39] (Figs 1 and 4).

**Stereoselectivity.** Attack on a Michael acceptor leads to saturation, increased flexibility, and depending on the reactant substitutions, to achiral products [46, 47] or products with one or two stereocenters [48, 49]. The crystal structure with BrOxoPA shows an enantioselective addition, 2S, at C2, while C3 remains achiral. Thus, the ketone oxygen of the inhibitor is positioned opposite to the PYC nitrogen observed in 1W62 (Fig 10A) [16], consistent with the larger available space in that direction. The BrOxoPA complex also shows that a second reaction took place, leading to a very tightly bound complex, as indicated by the cavity volume (Table 2). The saturation of C2 allows the folding of the molecule to position C5 and its bromine atom close to Cys130. The second attack released the bromine atom as reported for halo ketones [39] (Fig 10B).

NG-P27, with prochiral substituents on C3, can form a second stereocenter. According to the crystallographic data, the 2S,3R configuration prevailed. Hence, the inhibitor, with C2 positioned si-face adjacent to Cys300, allowed nucleophilic addition (S) through to a mesomeric enolate intermediate (Fig 9B). The S $\gamma$  atom of Cys300 orients the inhibitor towards conformation (I) by repulsion of the lone pair orbitals preventing (II), and allowing protonation by Cys130, in the 3R configuration. This anti-process mimics the proline stereo-inversion mechanism [16]. To our knowledge, the only other reported example of a diastereoselective Michael addition in the biological field also involves an anti-process [50] (see S4 Text).

### Impact of ligand binding on TcPRAC conformation

The effects of ligand binding on enzyme conformation range from the displacement of a few key residues [51] to global conformational changes [52]. The crystal structures show here a series of stable complexes in intermediate conformations representing a significant portion of the molecular mechanism (projections of protomer conformations ranging from 12 to 49% of the change on the axis between chains A and B of 1W62). This observation highlights the plasticity of the protein and its binding site. Interestingly, this flexibility does not preclude asymmetry, visible in the hemi-saturated form (1W62) and in forms bearing the same ligand in both sites (the OxoPA and NG-P27 complexes, see Fig 5A).

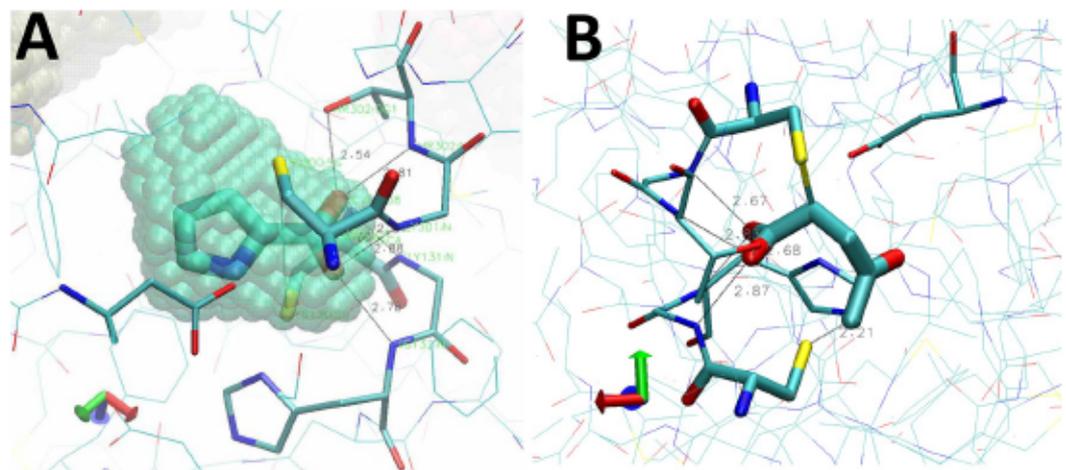
The protomer conformations appear to follow a mostly linear opening motion (Fig 5B). Nonetheless, projections of the dimers do not align (Fig 5A) indicating that within dimers, the protomer motions are not coupled in a linear fashion. This asymmetry can be related to the described binding anti-cooperativity of the dimers [16]. Interestingly, our transitional model [17] incorporated asymmetry compatible with the simulation force field.

In the active site, significant local reorganization such as refolding of the 130–132 loop is observed (Fig 5C). This refolding process is essential to establish interactions with the carboxylate moiety of the inhibitor and to position Cys130 for catalysis. Interestingly, in conf1A to conf10A of our transition model (Figs 5C and 6A), the 130–132 loop of chain A is folded as observed in the OxoPA and NG-P27 co-crystal structures (Fig 6B). The model for chain B was different and could represent a type of relaxations in the absence of ligand. The binding site conformation and the hydrogen bond network oriented our choice to use chain A of our transition model in our early design strategy [17].

The OxoPA and NG-P27 complex structures show that partial opening of the binding site was an appropriate assumption in our design approach. The conformation of monomer B in the OxoPA and NG-P27 complexes suggests that even larger ligands could be accommodated in the binding site (Table 2), possibly exploiting more open structures of our transitional model.

### Prospects

There is an urgent need to develop innovative drugs addressing neglected diseases, multi-drug resistance, and more broadly unmet therapeutic needs. As a new strategy for drug design, we



**Fig 10. Ligand pocket in TcPRAC.** (A) Volume available as seen in the 1W62 structure; protein atoms, lines; key residues, sticks; PYC, bold sticks; and cavity volume containing PYC, mesh of transparent spheres. (B) BrOxoPA after reaction showing bonds with the cysteines and bending of the originally flat molecule following C2 = C3 saturation.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006853.g010>

exploit protein functional motions to model plausible structural intermediates of a therapeutic target. We show here that the TcPRAC protein target adopted conformations strikingly close to those of the modeled intermediates, allowing us to design inhibitors that may lead to innovative treatments for Chagas disease. These results demonstrate how modeling protein functional motions can be exploited in a rational approach to create opportunities in drug design. This method should also be useful to complement information provided by static experimental structures for other targets involving functional molecular motions, such as GPCR, neuronal receptors, kinase involving allostery [53].

## Conclusion

Using functional intermediate models to design inhibitors proved successful with the identification of OxoPA, BrOxoPA, and finally NG-P27, a possible starting scaffold in the search for effective therapies against Chagas disease. The similarity between the binding site conformation in our models and in the crystallographic structures reported here demonstrates that computational approaches can make valuable hypotheses to exploit protein functional motions. As a perspective, this approach could also be useful to identify cryptic pockets which are now experimentally recognized as important in drug design [54].

## Supporting information

**S1 Spectra. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C spectra.**

(DOCX)

**S1 Table. TcPRAC / BrOxoPA intermolecular contacts. < 3.6 Å.**

(DOCX)

**S2 Table. TcPRAC / NG-P27 intermolecular contacts < 3.6 Å.**

(DOCX)

**S1 Text. General information on chemical synthesis.**

(DOCX)

**S2 Text. Synthetic procedures.**

(DOCX)

**S3 Text. Impact of ligand binding on TcPRAC conformation.**

(DOCX)

**S4 Text. Inhibition mechanism of TcPRAC.**

(DOCX)

## Acknowledgments

We acknowledge SOLEIL for provision of synchrotron radiation facilities and we would like to thank the staff of beamline PROXIMA 1 for assistance. The authors are grateful to the Staff of the Crystallography platform at the Institut Pasteur for robot-driven crystallization screenings.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Guilherme Dias de Melo, Nicolas Gouault, Sophie Goyard, Patricia Dutra, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Philippe Uriac, Arnaud Blondel, Paola Minoprio.

**Formal analysis:** Guilherme Dias de Melo, Nicolas Gouault, Sophie Goyard, Patricia Dutra, Nicolas Coatnoan, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Philippe Uriac, Arnaud Blondel.

**Funding acquisition:** Philippe Uriac, Arnaud Blondel, Paola Minoprio.

**Investigation:** Patricia de Aguiar Amaral, Delphine Autheman, Guilherme Dias de Melo, Jean-François Cupif, Sophie Goyard, Patricia Dutra, Nicolas Coatnoan, Alain Cosson, Damien Monet, Frederick Saul, Ahmed Haouz, Philippe Uriac.

**Project administration:** Paola Minoprio.

**Software:** Arnaud Blondel.

**Writing – original draft:** Guilherme Dias de Melo, Nicolas Gouault, Sophie Goyard, Philippe Uriac, Arnaud Blondel, Paola Minoprio.

**Writing – review & editing:** Frederick Saul, Ahmed Haouz, Philippe Uriac, Arnaud Blondel, Paola Minoprio.

## References

- Martins-Melo FR, Carneiro M, Ramos AN Jr., Heukelbach J, Ribeiro ALP, Wernick GL. The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990–2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018; 12(6):e0006559. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006559> PMID: 29864133
- O’Connell D. Neglected Diseases. *Nature*. 2007; 449(7159):157–.
- Salvatella R. Andean subregional Chagas disease area and the Andean initiative of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007; 102 Suppl 1:39–40. Epub 2007/10/02. PMID: 17906804.
- Chamond N, Coatnoan N, Minoprio P. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Current drug targets Immune, endocrine and metabolic disorders*. 2002; 2(3):247–54. Epub 2002/12/13. PMID: 12476489.
- Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*. 2014; 30(6):289–98. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>. PMID: 24776300
- Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002; 97(1):3–24. Epub 2002/05/07. PMID: 11992141.
- Morel CM, Carvalheiro JR, Romero CNP, Costa EA, Buss PM. The road to recovery. *Nature*. 2007; 449(7159):180–2. <https://doi.org/10.1038/449180a> PMID: 17851516
- WHO. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. Geneva, Switzerland. [http://www.who.int/neglected\\_diseases/9789241564861/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/9789241564861/en/); WHO Press, 2015.
- Gaspar L, Moraes CB, Freitas-Junior LH, Ferrari S, Costantino L, Costi MP, et al. Current and Future Chemotherapy for Chagas Disease. *Current medicinal chemistry*. 2015; 22(37):4293–312. Epub 2015/10/20. PMID: 26477622.
- De Pablos LM, Osuna A. Multigene families in *Trypanosoma cruzi* and their role in infectivity. *Infect Immun*. 2012; 80(7):2258–64. Epub 2012/03/21. <https://doi.org/10.1128/IAI.06225-11> PMID: 22431647; PubMed Central PMCID: PMC3416482.
- Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N, Cordeiro-Da-Silva A, et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nature medicine*. 2000; 6(8):890–7. Epub 2000/08/10. <https://doi.org/10.1038/78651> PMID: 10932226.
- Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *The Journal of biological chemistry*. 2003; 278(18):15484–94. Epub 2003/05/09. PMID: 12735293.
- Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degraeve WM, et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. *Molecular microbiology*. 2005; 58(1):46–60. Epub 2005/09/17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04808.x> PMID: 16164548.
- Keenan MV, Alworth WL. The inhibition of proline racemase by a transition state analogue: delta-1-pyrroline-2-carboxylate. *Biochemical and biophysical research communications*. 1974; 57(2):500–4. Epub 1974/03/25. PMID: 4829407.

15. Coutinho L, Ferreira MA, Cosson A, Batista MM, Batista Dda G, Minoprio P, et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009; 104(8):1055–62. Epub 2010/02/09. PMID: [20140365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20140365/).
16. Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degraeve W, Shepard W, Gregoire C, et al. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103(6):1705–10. Epub 2006/02/01. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509010103> PMID: [16446443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16446443/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC1413642](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC1413642/).
17. Bememan A, Montout L, Goyard S, Chamond N, Cosson A, d'Archivio S, et al. Combined Approaches for Drug Design Points the Way to Novel Proline Racemase Inhibitor Candidates to Fight Chagas' Disease. *PLoS ONE*. 2013; 8(4):e60955. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060955> PMID: [23613764](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23613764/)
18. Gouault N, Pinel B, Cupif JF, Depince A, Martin-Chouly CA, Belleguic C, et al. Synthesis and potential anti-inflammatory activity of some tetrahydrophthalazinones. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2004; 19(6):475–80. Epub 2005/01/25. <https://doi.org/10.1080/14756360412331280536> PMID: [15662951](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15662951/).
19. Singh J, Petter RC, Baillie TA, Whitty A. The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2011; 10(4):307–17. [http://www.nature.com/nrd/journal/v10/n4/supplinfo/nrd3410\\_S1.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v10/n4/supplinfo/nrd3410_S1.html). <https://doi.org/10.1038/nrd3410> PMID: [2145239](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2145239/)
20. Backus KM, Correia BE, Lum KM, Forli S, Homing BD, González-Páez GE, et al. Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature*. 2016; 534(7608):570–4. <https://doi.org/10.1038/nature18002> <http://www.nature.com/nature/journal/v534/n7608/abs/nature18002.html#supplementary-information>. PMID: [27309814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27309814/)
21. Robertson A. Changes in South Australian children's caries experience (continued from *Aust Dent J* 2004;49:212). *Aust Dent J*. 2005; 50(1):61. PMID: [15881308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15881308/).
22. Kwong AD, Kauffman RS, Hurler P, Mueller P. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nature biotechnology*. 2011; 29(11):993–1003. Epub 2011/11/10. <https://doi.org/10.1038/nbt.2020> PMID: [22068541](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22068541/).
23. Olbe L, Carlsson E, Lindberg P. A proton-pump inhibitor expedition: the case histories of omeprazole and esomeprazole. *Nat Rev Drug Discov*. 2003; 2(2):132–9. Epub 2003/02/04. <https://doi.org/10.1038/nrd1010> PMID: [12563304](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12563304/).
24. Brak K, Doyle PS, McKerrow JH, Ellman JA. Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain. *Journal of the American Chemical Society*. 2008; 130(20):6404–10. Epub 2008/04/26. <https://doi.org/10.1021/ja710254m> PMID: [18435536](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18435536/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2765048](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2765048/).
25. Brak K, Kerr ID, Barrett KT, Fuchi N, Debnath M, Ang K, et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. *Journal of medicinal chemistry*. 2010; 53(4):1763–73. Epub 2010/01/22. <https://doi.org/10.1021/jm901633v> PMID: [20088534](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20088534/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2838180](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2838180/).
26. Dam J, Blondel A. Effect of multiple symmetries on the association of R67 DHFR subunits bearing interfacial complementing mutations. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*. 2004; 13(1):1–14. <https://doi.org/10.1110/ps.03309504> PMCID: [PMC2286515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2286515/). PMID: [14691216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14691216/)
27. Dam J, Rose T, Goldberg ME, Blondel A. Complementation between dimeric mutants as a probe of dimer-dimer interactions in tetrameric dihydrofolate reductase encoded by R67 plasmid of *E. coli*. *Journal of molecular biology*. 2000; 302(1):235–50. Epub 2000/08/31. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4051> PMID: [10964572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10964572/).
28. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2010; 66(Pt 2):125–32. <https://doi.org/10.1107/S0907444909047337> PMCID: [PMC2815665](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2815665/). PMID: [20124692](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20124692/)
29. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. 2011; 67(Pt 4):235–42. <https://doi.org/10.1107/S0907444910045749> PMCID: [PMC3069738](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC3069738/). PMID: [21460441](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21460441/)
30. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography*. 2007; 40(Pt 4):658–74. Epub 2007/08/01. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206> PMID: [19461840](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19461840/); PubMed Central PMCID: [PMCPMC2483472](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC2483472/).
31. Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 1997; 53(Pt 3):240–55. Epub 1997/05/01. <https://doi.org/10.1107/S0907444996012255> PMID: [15299926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15299926/).
32. Emsley P, Cowtan K. Coot model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography*. 2004; 60(Pt 12 Pt 1):2126–32. Epub 2004/12/02. <https://doi.org/10.1107/s0907444904019158> PMID: [15572765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15572765/).

33. Gouault N, Cupif J-F, Amoros M, David M. Expedient method for the solid-phase synthesis of some 4-substituted-4,5-dihydropyridazin-3(2H)-ones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. 2002;(20):2234–6. <https://doi.org/10.1039/B205607K>
34. Kumar N, Read R. Synthesis of cyclic compounds. *PCT Int Appl* 2002;WO/2002/000639 <https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2002000639>.
35. Moon JT, Ha SH, Lee SH, Kwon TH, Oh CR, Kim YD, et al. Total synthesis and biological evaluation of methylgerambullone. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2010; 20(1):52–5. Epub 2009/12/01. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.040> PMID: 19945876.
36. Taly A, Colas C, Malliavin T, Blondel A, Nilges M, Corringer PJ, et al. Discrimination of agonists versus antagonists of nicotinic ligands based on docking onto AChBP structures. *Journal of molecular graphics & modelling*. 2011; 30:100–9. Epub 2011/07/19. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.06.008> PMID: 21764343.
37. Desdouts N, Nilges M, Blondel A. Principal Component Analysis reveals correlation of cavities evolution and functional motions in proteins. *Journal of molecular graphics & modelling*. 2015; 55:13–24. Epub 2014/11/27. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.10.011> PMID: 25424655.
38. Goyard S, Dutra PL, Deolindo P, Autheman D, D'Archivio S, Minoprio P. In vivo imaging of trypanosomes for a better assessment of host-parasite relationships and drug efficacy. *Parasitology international*. 2014; 63(1):260–8. Epub 2013/07/31. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.07.011> PMID: 23892180.
39. Powers JC, Asgian JL, Ekici OD, James KE. Irreversible inhibitors of serine, cysteine, and threonine proteases. *Chemical reviews*. 2002; 102(12):4639–750. Epub 2002/12/12. PMID: 12475205.
40. Santos MM, Moreira R. Michael acceptors as cysteine protease inhibitors. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2007; 7(10):1040–50. Epub 2007/11/06. PMID: 17979807.
41. Laine E, Goncalves C, Karst JC, Lesnard A, Rault S, Tang WJ, et al. Use of allostery to identify inhibitors of calmodulin-induced activation of Bacillus anthracis edema factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010; 107(25):1277–82. Epub 2010/06/11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914611107> PMID: 20534570; PubMed Central PMCID: PMC2895076.
42. Huizenga DE, Szostak JW. A DNA aptamer that binds adenosine and ATP. *Biochemistry*. 1995; 34(2):656–65. Epub 1995/01/17. PMID: 7819261.
43. Vosyka O, Vinothkumar KR, Wolf EV, Brouwer AJ, Liskamp RM, Verhelst SH. Activity-based probes for rhomboid proteases discovered in a mass spectrometry-based assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013; 110(7):2472–7. Epub 2013/01/30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1215076110> PMID: 23359682; PubMed Central PMCID: PMC3574917.
44. Tan X, Soualmia F, Furio L, Renard JF, Kempen I, Qin L, et al. Toward the first class of suicide inhibitors of kallikreins involved in skin diseases. *Journal of medicinal chemistry*. 2015; 58(2):598–612. Epub 2014/12/10. <https://doi.org/10.1021/jm500988d> PMID: 25489658.
45. Ekici OD, Li ZZ, Campbell AJ, James KE, Asgian JL, Mikolajczyk J, et al. Design, synthesis, and evaluation of aza-peptide Michael acceptors as selective and potent inhibitors of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10. *Journal of medicinal chemistry*. 2006; 49(19):5728–49. Epub 2006/09/15. <https://doi.org/10.1021/jm0601405> PMID: 16970398.
46. Huang Z, Tan L, Wang H, Liu Y, Blais S, Deng J, et al. DFG-out mode of inhibition by an irreversible type-1 inhibitor capable of overcoming gate-keeper mutations in FGF receptors. *ACS chemical biology*. 2015; 10(1):299–309. Epub 2014/10/16. <https://doi.org/10.1021/cb500674s> PMID: 25317566; PubMed Central PMCID: PMC4301177.
47. Wu H, Wang W, Liu F, Weisberg EL, Tian B, Chen Y, et al. Discovery of a potent, covalent BTK inhibitor for B-cell lymphoma. *ACS chemical biology*. 2014; 9(5):1086–91. Epub 2014/02/22. <https://doi.org/10.1021/cb4008524> PMID: 24556163; PubMed Central PMCID: PMC34027949.
48. Tan J, George S, Kusov Y, Perbandt M, Anemuller S, Mesters JR, et al. 3C protease of enterovirus 68: structure-based design of Michael acceptor inhibitors and their broad-spectrum antiviral effects against picornaviruses. *Journal of virology*. 2013; 87(8):4339–51. Epub 2013/02/08. <https://doi.org/10.1128/JVI.01123-12> PMID: 23388726; PubMed Central PMCID: PMC3624371.
49. Matthews DA, Dragovich PS, Webber SE, Fuhman SA, Patick AK, Zalman LS, et al. Structure-assisted design of mechanism-based irreversible inhibitors of human rhinovirus 3C protease with potent antiviral activity against multiple rhinovirus serotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999; 96(20):11000–7. Epub 1999/09/29. PMID: 10500114; PubMed Central PMCID: PMC34232.
50. Krishnan S, Miller RM, Tian B, Mullins RD, Jacobson MP, Taunton J. Design of Reversible, Cysteine-Targeted Michael Acceptors Guided by Kinetic and Computational Analysis. *Journal of the American Chemical Society*. 2014; 136(36):12624–30. <https://doi.org/10.1021/ja505194w> PMID: 25153195

51. Cavalier MC, Ansari MI, Pierce AD, Wilder PT, McKnight LE, Raman EP, et al. Small Molecule Inhibitors of Ca<sup>2+</sup>-S100B Reveal Two Protein Conformations. *Journal of medicinal chemistry*. 2016; 59(2):592–608. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01369> PMID: [26727270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26727270/)
52. Sirigu S, Hartman JJ, Planelles-Herrero VJ, Ropars V, Clancy S, Wang X, et al. Highly selective inhibition of myosin motors provides the basis of potential therapeutic application. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016; 113(47):E7448–E55. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609342113> PMID: [27815532](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27815532/)
53. Wenthur CJ, Gentry PR, Mathews TP, Lindsley CW. Drugs for allosteric sites on receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2014; 54:165–84. Epub 2013/10/12. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010611-134525> PMID: [24111540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24111540/); PubMed Central PMCID: [PMC4063350](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4063350/).
54. Lee C-J, Liang X, Wu Q, Najeeb J, Zhao J, Gopalswamy R, et al. Drug design from the cryptic inhibitor envelope. *Nature Communications*. 2016; 7:10638. <https://doi.org/10.1038/ncomms10638> PMID: [26912110](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26912110/)

#### **IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES**

#### IV.1. Vers une amélioration de la sensibilité des tests diagnostiques utilisant la *TcPRAC* comme biomarqueur

L'invention de la technologie des hybridomes par Kohler et Milstein, qui leur a valu le prix Nobel de Médecine en 1984, a permis l'obtention d'anticorps monoclonaux (AcM) c'est à dire une population homogène d'immunoglobulines de haute spécificité dirigées contre un épitope unique (Kohler & Milstein 1975). Une des propriétés majeures des AcM est leur haute spécificité pour un épitope donné comparativement à un sérum polyclonal contenant des anticorps polyclonaux reconnaissant différents épitopes et pouvant entraîner des problèmes de réactions croisées avec d'autres antigènes (Kohler & Milstein 1976). Ainsi, de nombreux tests pour le diagnostic de nombreuses maladies infectieuses ont été mis au point. La détection spécifique d'un pathogène, voire un sérotype particulier, est obtenu grâce à la reconnaissance d'un épitope ciblé du pathogène par l'anticorps monoclonal. La liste des anticorps monoclonaux développés depuis la fin des années 1970 est longue ainsi que ceux développés en tant que kits diagnostiques commerciaux (Saleem & Kamal 2008 ; Ziddiqui MZ 2010).

Notre travail nous a permis de détecter et de quantifier, par la technique ELISA, les taux de *TcPRAC* circulante présents dans des sérums de souris infectées par deux souches polaires de *T. cruzi*, pendant les phases aiguë et chronique de l'infection. Cette découverte est importante car la *TcPRAC* est exprimée et produite spécifiquement par *T. cruzi*. Ces données pourraient s'avérer capitales pour le développement d'un nouveau test pour la Maladie de Chagas. Or, il ne nous a pas été possible d'augmenter la sensibilité du test utilisant un sérum polyclonal anti-*TcPRAC* pour la capture et un AcM pour la révélation. Le test utilisant la combinaison de deux AcM, reconnaissant des épitopes différents, pour la capture et pour la révélation ne nous a pas permis de détecter la *TcPRAC* circulante dans ces mêmes sérums murins infectés par *T. cruzi*. Au cours de notre travail, huit AcM dirigés contre la *TcPRAC* ont été produits par nos collaborateurs de chez bioMérieux. Ces anticorps ont été obtenus après trois immunisations de souris par une préparation « fraîche » de la *TcPRAC* recombinante sous sa forme active et purifiée par colonne d'affinité. Les surnageants de culture issus des différents clones d'hybridomes obtenus ont été testés par ELISA contre la protéine recombinante et contre la protéine native issue des extraits totaux cytoplasmiques des formes épimastigotes de culture. Dans les deux cas, les résultats ont montré une très bonne reconnaissance de la *TcPRAC* (recombinante et native). Des études de complémentarité ont montré que les clones #13C4B5 et #5C9D7 présentaient les meilleures affinités pour la *TcPRAC*. De plus, des tests de compétition ont montré que ces deux AcM reconnaissaient des épitopes différents de la *TcPRAC*.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Nous savons que la *TcPRAC* recombinante est stable et active au moins une semaine lorsqu'elle est conservée à 4°C (Chamond et al 2003). Passé ce délai ou après congélation/décongélation, nous savons que la protéine a tendance à se dénaturer en précipitant et en formant des agrégats. Si les immunisations sont réalisées avec une protéine dénaturée, cela pourrait expliquer que les AcM obtenus soient peu spécifiques. Néanmoins, nous avons utilisé une préparation de *TcPRAC* active sous sa forme homodimérique, c'est à dire non dégradée. Pour cela, l'activité

de l'enzyme a été confirmée par un test de racémisation de la L-proline, utilisé en routine au laboratoire extemporanément à sa purification. Une autre hypothèse envisageable est que, malgré nos précautions, la *TcPRAC* recombinante utilisée pour les immunisations était dénaturée et donc sous une autre conformation pouvant de ce fait masquer des épitopes conformationnels immunodominants et donc moins immunogéniques. Dans ce cas, les AcM produits reconnaîtraient des épitopes de la forme recombinante et non pas de la forme circulante présente dans les sérums.

Un « épitope mapping » des AcM n'a pas pu être réalisé. Cela nous aurait permis d'obtenir des informations importantes concernant quels sont les épitopes de la *TcPRAC* reconnus par ces anticorps. Reconnaissent-ils des épitopes minoritaires ? Ces épitopes sont-ils moins accessibles sur la protéine native ? Ou encore, s'agirait-il d'épitopes conformationnels ? Notre connaissance de la structure tridimensionnelle de la *TcPRAC* nous aurait permis de répondre à ces questions.

Les premiers essais réalisés chez l'Homme n'ont pas été aussi concluants que ceux obtenus en préclinique chez le modèle expérimental mais ont soulevé de nombreuses questions relatives à la sensibilité du test de détection, à la possibilité d'étudier plus en détail les relations entre positivité du test vis à vis d'autres tests diagnostiques, vis à vis du suivi de l'efficacité du traitement et vis à vis des différentes complications de la Maladie durant la phase chronique symptomatique. Plusieurs hypothèses ont été soulevées.

D'une part, la non-détection de la *TcPRAC* circulante chez la majorité des patients chagasiques non « traités » peut être expliquée par le fait que la congélation/décongélation des sérums aient pu entraîner une dégradation de la *TcPRAC* circulante sérique et ainsi empêcher la détection de cette dernière par les anticorps anti-*TcPRAC* en raison d'une perte de reconnaissance d'épitopes de nature conformationnelle. Nous avons tenté de répondre à cette question, en testant sept sérums frais (dont 2 témoins négatifs) issus de patients chagasiques chroniques asymptomatiques ne présentant pas de perturbations cardiaques et n'ayant jamais été traités pour la Maladie de Chagas. L'utilisation de deux combinaisons d'ELISA sandwich n'ont pas apporté de réponse formelle, car un sérum sur cinq a été détecté positif pour la *TcPRAC* circulante, par rapport aux individus témoins. Lors de ces tests, nous ne disposions pas d'informations sur la charge parasitaire de ces patients au moment des prélèvements.

Une autre hypothèse également suggérée préalablement est que les taux de *TcPRAC* circulante dans les sérums de patients « chroniques » seraient inférieurs au seuil de détection des tests, sachant que très peu de parasites sont circulants pendant les phases tardives de l'infection. Des études ont montré que l'Homme s'infectait, via les fèces de l'insecte vecteur, avec  $10^4$  ou  $10^5$  trypanostigotes métacycliques (Kollien & Schaub 1998 ; Kollien & Schaub 2000). Dans le modèle expérimental, les souris ont été infectées avec  $10^3$  trypanostigotes pour l'étude de la phase chronique. La charge parasitaire « relative » serait donc plus importante dans le modèle murin, c'est à dire une concentration de *TcPRAC* sérique supérieure au seuil de détection des tests, et expliquerait pourquoi nous avons réussi à détecter la *TcPRAC* circulante dans les sérums « chroniques » de souris. Sachant que la charge

parasitaire est plus élevée au début de l'infection, nous avons pu tester un petit échantillon de plasmas (conservés congelés) issus d'une cohorte d'enfants chagasiques durant la phase aiguë. Deux hypothèses pourraient expliquer les résultats négatifs obtenus : les tests ELISA manquent de sensibilité pour détecter des quantités très faibles de la protéine dans la circulation. Pour augmenter les chances de détection, nous pourrions envisager d'utiliser des méthodes de concentrations des sérums et/ou plasma. D'autre part, il est possible que la détection de la TcPRAC circulante ne soit pas faisable au niveau du plasma. Nous ne pouvons pas exclure que le test de détection de la TcPRAC circulante ne soit pas idéal. Des nouveaux essais avec des sérums frais seraient donc à envisager. La mise en place d'un test plus sensible chez l'Homme, pourrait se baser sur la production et sélection d'anticorps monoclonaux de part leurs propriétés d'affinité sur la TcPRAC native. Ceux que nous avons utilisés pour la mise au point du test ELISA sandwich se sont avérés être 100 fois plus sensibles lorsqu'ils sont testés sur une gamme standard utilisant des quantités connues de TcPRAC recombinante comparativement au test utilisant un sérum polyclonal pour la capture.

D'autre part, nous avons pu détecter la présence de TcPRAC circulante chez deux individus présentant une cardiopathie chagastique. Le tableau de contingence (Figure 11 page 77) prenant en compte les résultats du test obtenus uniquement sur les patients ayant développés les complications cardiaques et comparé à un nombre équivalent de témoins non infectés, la spécificité du test et la valeur prédictive positive (VPP) sont de 100%. Pour les tests de dépistage, plus le test est spécifique, moins le nombre de faux positifs est retrouvé et donc meilleur est le test pour confirmer une pathologie. De façon intéressante, ces résultats pourraient indiquer que la TcPRAC pourrait être un « biomarqueur » de la cardiopathie chagastique chronique, sachant que 2 des 3 individus cardiopathes ont été testés positifs. Bien évidemment, des études sur une cohorte comprenant un nombre plus importante d'individus seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse et qui nécessiterait également l'inclusion de patients présentant une cardiopathie non chagastique (i.e. témoins négatifs).

Par ailleurs, nos résultats ont été discordants avec les résultats obtenus par PCR effectuées à l'IMT. Notre méthodologie basée sur la détection d'un « biomarqueur » présent dans le sérum pourrait permettre dans ce cas une détection plus sensible du parasite et révélerait deux échecs thérapeutiques supplémentaires. Cependant, nous écartons pour l'instant cette hypothèse car parmi les autres sérums de patients testés à partir de la cohorte « chronique » considérés comme en échec thérapeutique ou présentant d'autres statut clinique, notre test n'a pas permis la détection de la TcPRAC circulante dans ces sérums en question. Nous n'avons pas pu avoir accès à des échantillons sanguins de ces mêmes patients afin de réaliser des tests PCR utilisant les amorces amplifiant les gènes *TcPRAC*. Ces tests nous auraient permis d'obtenir des informations supplémentaires concernant l'efficacité des traitements reçus pour ces patients.

Toutes ces questions soulèvent l'importance d'utiliser une cohorte de patients bien définie, comportant un nombre suffisant d'échantillon dans l'objectif d'analyser le potentiel diagnostique de la TcPRAC au cours d'études ultérieures afin de valider ou non les différentes phases cliniques.

## IV.2. Améliorations du prototype pour la détection du parasite *in vivo*

*In vivo*, grâce à leur petite taille et à leur solubilité élevée, les V<sub>H</sub>H ont démontré qu'ils présentaient de bonnes capacités de diffusion et de pénétration dans les tissus (Van Bockstaele et al 2009). Ils sont de plus en plus utilisés en préclinique en tant que traceur *in vivo* par imagerie médicale, notamment pour la détection rapide de cellules tumorales où ils ont démontré de meilleures performances que les anticorps monoclonaux (Hu et al 2015).

Aujourd'hui, la guérison d'un patient chagastique ne peut être confirmée qu'après la séroconversion des tests sérologiques recommandés par l'OMS, qui interviennent plusieurs années post-traitement car le parasite étant plutôt intracellulaire dans les tissus, il est difficile de démontrer sa présence ou son absence. Ainsi, il serait important de mettre au point un test, si possible non invasif, permettant la détection du parasite au niveau tissulaire.

Nous tentons de développer une méthodologie non invasive *in vivo* utilisant les dernières techniques de pointe d'imagerie médicale et des V<sub>H</sub>H marqués, avec une molécule rapporteuse, et dirigés contre une protéine spécifique de *Trypanosoma cruzi* : la TcPRAC. Les premières expériences, effectuées chez le modèle expérimental, ayant utilisées trois V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC, sélectionnés en fonction de leur haute affinité pour la TcPRAC et marqués avec l'IRDye 800 CW ne nous ont pas permis de visualiser les parasites intracellulaires *in vivo* par imagerie optique. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ces premiers résultats négatifs.

Les mécanismes permettant la pénétration de certains V<sub>H</sub>H dans les cellules n'ont pas été encore élucidés. Ces mécanismes feraient appel à des phénomènes d'endocytose et/ou de transcytose clathrine-dépendante et/ou de translocation à travers la membrane plasmique (Abulrob et al 2005 ; Herce & Garcia 2007). Dans ce cas, on pourrait envisager que les quantités de V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC injectées puis internalisées dans les cellules infectées n'aient pas été suffisantes pour permettre la détection d'un signal suffisamment fort pour visualiser les parasites au delà du signal non spécifique correspondant au bruit de fond. Pourtant, il a été montré que l'injection de V<sub>H</sub>H à des quantités comprises entre 25 et 50µg étaient suffisantes pour acquérir des images significatives par rapport au bruit de fond qui correspondait à la circulation des anticorps circulants qui ne se sont pas fixés à leur cible (Oliveira et al 2012). Par ailleurs, nous avons également pris soin de sélectionner des V<sub>H</sub>H présentant des points isoélectriques théoriques basiques, condition importante pour permettre leur internalisation dans les cellules, comme préalablement démontré par d'autres auteurs (Li et al 2012). Malgré cette précaution, nous n'écartons pas le fait que les points isoélectriques de ces anticorps ne soient pas suffisamment basiques pour permettre leur pénétration.

Il est important de noter que leur petite taille et leur solubilité leur confèrent de bonnes propriétés de diffusion et de pénétration dans les tissus mais la contrepartie est que ces anticorps sont éliminés très rapidement de la circulation car leur taille est inférieure au seuil de filtration glomérulaire (Schmidt & Wittrop 2009 ; Kijanka et al 2013). Une solution pour surpasser cette difficulté serait, par exemple, de produire des V<sub>H</sub>H bivalents c'est à dire deux V<sub>H</sub>H fusionnés, un reconnaissant la protéine d'intérêt et l'autre l'albumine sérique, sachant

que l'albumine est particulièrement recrutée au niveau des sites d'inflammation. Il serait ainsi envisageable de produire des  $V_{HH}$  bivalents : un  $V_{HH}$  reconnaissant la  $TcPRAC$ , couplé à un autre  $V_{HH}$  reconnaissant l'albumine pour augmenter de façon significative le temps de circulation de ces anticorps (Tijink et al 2008 ; Vosjan et al 2012). En augmentant la demi-vie de ces anticorps, nous augmentons également le temps de circulation de ces anticorps et également le temps de « reconnaissance » de la  $TcPRAC$  produite par les parasites intracellulaires. L'augmentation du temps de circulation de ces anticorps pourrait être nécessaire pour une accumulation suffisante de signaux fluorescents pour une détection significative du parasite. Cette possibilité est confortée par les résultats positifs obtenus *in vitro* où les temps d'incubation utilisés avec les  $V_{HH}$  marqués à l'Alexa 488 pour visualiser la  $TcPRAC$  intracellulaire des parasites de culture étaient significativement plus élevés que la demi-vie du  $V_{HH}$  estimée à 1,5 heures dans la circulation (Hu et al 2017).

Nous avons également émis l'hypothèse d'un problème de marquage des  $V_{HH}$  anti- $TcPRAC$  avec l'IRDye 800 CW, qui est une molécule hydrophobe. L'Alexa 488 et les  $V_{HH}$  sont hydrophiles, ce qui permet un marquage plus stable. Les résultats positifs obtenus *in vitro* avec l'utilisation des  $V_{HH}$  anti- $TcPRAC$  couplés à l'Alexa 488 vont dans ce sens. L'efficacité des marquages des  $V_{HH}$  anti- $TcPRAC$  avec l'IRDye 800 CW a peut-être été moins stable et aurait entraîné une dissociation du fluorochrome en condition *in vivo*. Une information importante renforçant cette hypothèse est l'observation d'un marquage élevé et inattendu au niveau du foie, organe d'élimination des molécules hydrophobes et des corps gras, alors que les  $V_{HH}$ , de nature protéique, sont éliminés par voie rénale.

#### **IV.3. Perspectives diagnostiques : des $V_{HH}$ pour la mise au point de tests de détection**

Le développement de  $V_{HH}$  à des fins diagnostiques pourrait permettre de mettre au point de nouveaux tests par rapport à ceux développés jusqu'à présent avec des anticorps « conventionnels ». La production des  $V_{HH}$  à grande échelle peut être réalisée à moindre coût. Ils présentent également des propriétés d'affinité élevée pour la reconnaissance de l'antigène (Hamers-Casterman et al 1993). Ils sont plus stables grâce à leur structure monomérique. Le domaine CDR3 peut être exprimé sous forme d'une longue boucle permettant l'accès à des épitopes cryptiques, concaves ou masqués, ou encore difficilement accessibles par les anticorps conventionnels (De Genst et al 2006 ; Muyldermans et al 2009 ; Garza et al 2017).

Une sélection rigoureuse de  $V_{HH}$  a permis la mise au point de tests plus sensibles que ceux effectués avec des anticorps « conventionnels » de nature moins stable (Dona et al 2010 ; He et al 2014). D'autres tests de détection, utilisant des  $V_{HH}$ , ont été mis au point avec succès pour la détection de petites molécules telles que des toxines ou des contaminants dans des produits agro-alimentaires (Li et al 2014 ; Wang et al 2015). Toutefois, l'unique domaine du  $V_{HH}$  peut être un désavantage pour la reconnaissance de petites molécules comme par exemple les haptènes, reconnus à l'interface des domaines  $V_H-V_L$  des anticorps « conventionnels » (Fanning & Horn 2011 ; Bever et al 2016).

Récemment, deux tests diagnostiques (ELISA sandwich et Immuno-PCR) ont permis la détection de l'alpha-fétoprotéine, un biomarqueur tumoral, de façon ultrasensible grâce à la

production de deux V<sub>H</sub>H « modifiés » (Chen et al 2016). Pour le développement des tests, les V<sub>H</sub>H n'ont pas été utilisés sous leur forme « monomérique ». Adsorber des anticorps de petites tailles sur un support plastique, pour la capture dans un test ELISA par exemple, engendre une proximité de ces anticorps avec le support qui peut gêner l'interaction avec l'antigène (Saerens et al 2005). L'utilisation de V<sub>H</sub>H fusionnés avec une molécule de biotine en position C-terminale sur un support préalablement recouvert de streptavidine permet de « diriger » les paratopes (situés en position N-terminale) et ainsi d'augmenter significativement l'accessibilité et la sensibilité de détection pour l'antigène (Wang et al 2014 ; Zhu et al 2014 ; Rossotti et al 2015). La fusion avec d'autres protéines ou peptides, une « queue myc-histidine » ou encore un fragment Fc, a permis également d'augmenter les performances de capture des tests (Saerens et al 2005 ; Even-Desrumeaux et al 2010 ; Harmsen et al 2012). De plus, la fusion de V<sub>H</sub>H avec des molécules rapporteuses comme la phosphatase alcaline (PA) ou l'HRP a démontré des performances de détection de l'antigène à des concentrations de l'ordre du « nanomolaire » voire du « picomolaire » lorsqu'ils sont utilisés pour la capture et/ou pour la révélation (Swain et al 2011 ; Rossotti et al 2015 ; Liu et al 2015).

Dans le domaine des Maladies tropicales négligées, quelques travaux ont permis de mettre en avant les performances diagnostiques et/ou thérapeutiques potentielles des V<sub>H</sub>H (voir Figure 18). C'est le cas par exemple du développement d'un test diagnostique rapide sur bandelette pour la détection du virus de la Dengue de type 2 (Fatima et al 2014). La production d'anticorps monoclonaux et de V<sub>H</sub>H dirigés contre le même antigène viral a montré des séquences consensus au niveau des domaines CDR3, suggérant ainsi que les deux types d'anticorps produits reconnaissent les mêmes épitopes. Pourtant, lors des mises en application des tests, après sélection des deux meilleurs « candidats », le test effectué avec le V<sub>H</sub>H s'est avéré plus spécifique et plus sensible. Il semblerait, dans cette situation, que le domaine CDR3 plus long et présenté sous forme de boucle par le V<sub>H</sub>H permet une meilleure reconnaissance de l'antigène (Fatima et al 2014).

Cette propriété propre aux V<sub>H</sub>H a également été mise en avant dans une autre étude concernant la Maladie du sommeil animale provoquée entre autres par *Trypanosoma brucei brucei*. Que ce soit pour la Maladie du sommeil humaine ou animale, les trypanosomes responsables de ces pathologies ont mis au point une stratégie d'échappement au système immunitaire de l'hôte : la variation antigénique. Cette stratégie consiste à exprimer et à renouveler à des temps réguliers une matrice dense constituée de glycoprotéines variables (VSG pour *Variable Surface Glycoprotein*) hautement immunogéniques exprimées à la surface du trypanosome permettant ainsi la non accessibilité au système immunitaire de l'Hôte à des antigènes non variables (Morrison et al 2009 ; Engstler et al 2007 ; Barry et al 2005). Stijlemans et ses collaborateurs ont réussi à produire un V<sub>H</sub>H capable de reconnaître et d'accéder à un épitope commun, aux différentes sous-classes des VSG, situé à la base de la matrice extracellulaire du trypanosome permettant ainsi la mise en place d'un test diagnostique spécifique et sensible pouvant être réalisé directement sur des frottis sanguins (Stijlemans et al 2004).

NTD	Target	Camelid	Producing host	Proposed use
Chagas disease	Recombinant trans-sialidase (TcTS)	Llama	<i>E. coli</i>	Alternative chemotherapy
Dengue	NS1 protein (dengue virus—type 2)	Llama	<i>E. coli</i>	Point-of-care devices
Human African trypanosomiasis (sleeping sickness)	<i>Trypanosoma brucei brucei</i> specific variant surface glycoprotein (VSG)	Dromedary	<i>E. coli</i>	Alternative treatment
	Anti-VSG V <sub>H</sub> H conjugated with a truncated apolipoprotein L-I	Dromedary	<i>E. coli</i>	Alternative treatment
	<i>T. brucei brucei</i> specific VSG	Dromedary	<i>Sodalis glossinidius</i>	Alternative treatment—paratransgenesis
	<i>T. brucei</i> KREPA6 multi-functional editosome protein	Llama	<i>E. coli</i>	Structural protein studies
	Paraflagellar rod protein	Alpaca	<i>E. coli</i>	Diagnostic tool—one-step direct immunofluorescence
	Tsal protein	Alpaca	<i>E. coli</i>	Diagnostic tool—competitive immunoassay
Leishmaniasis	Endonuclease G	Llama	<i>E. coli</i>	Research tool
Rabies	Glycoprotein G	Llama	<i>E. coli</i> / <i>Pichia pastoris</i>	Postexposure prophylaxis
Schistosomiasis	<i>S. mansoni</i> Cathepsin B and excretory/secretory antigen	Camel	<i>E. coli</i>	Diagnostic and therapeutic applications
Cysticercosis	<i>Taenia solium</i> Ts14 glycoprotein	Dromedary	<i>E. coli</i>	Specific diagnostic assay

**Figure 18 : vue d'ensemble des publications utilisant des anticorps V<sub>H</sub>H contre les Maladies Tropicales Négligées (MTN). Extrait de Frontiers in Immunology. Fernandes CFC et al (2017).**

Le taux de *Tc*PRAC circulante, sécrétée/excrétée par les parasites, doit être corrélé au nombre de parasites circulants et donc doit être présente en faible quantité dans les sérums de patients chagasiques en phase chronique. Chez les patients ayant reçu un traitement contre la Maladie de Chagas (ou pour un test de confirmation diagnostique), ce sont des tests par PCR qui sont effectués car ils permettent de donner une appréciation « plus rapide » concernant les patients ayant répondu ou non au traitement. En effet, la séroconversion des anticorps anti *T. cruzi* indiquant que le patient est guéri peut avoir lieu plusieurs années après la fin du traitement (Cançado JR 2002 ; Viotti et al 2011). L'amplification potentielle de l'ADN des parasites circulants par PCR est un test direct représentatif de la parasitémie au moment du prélèvement. Pourtant, plusieurs tests sont réalisés à différents mois d'intervalle car il a été montré que la parasitémie peut être fluctuante, c'est à dire que durant la phase chronique, un certain nombre de parasites sont présents dans la circulation mais par intermittence (Murcia et al 2010). Chez le modèle expérimental murin, il a été démontré que l'infection chronique était dynamique de façon spatiotemporelle (Lewis et al 2014). Dans ce cas, si le parasite est toujours circulant même pendant la phase chronique, il est concevable d'émettre l'hypothèse qu'il doit y avoir également la présence de *Tc*PRAC circulante. Dans le modèle expérimental, nous avons démontré que le *Tc*PRAC circulante était toujours détectable dans les sérums murins « chroniques ».

Certains tests de détection mis au point avec des V<sub>H</sub>H dirigés contre les antigènes d'intérêt ont démontré de hautes performances de sensibilité (Zhu et al 2014 ; Wang et al 2014 ; Rossotti et al 2015). Il serait ainsi envisageable de développer des tests utilisant des V<sub>H</sub>H anti-*Tc*PRAC qui pourraient nous permettre d'obtenir une meilleure sensibilité que celle obtenue avec les anticorps polyclonaux et monoclonaux anti-*Tc*PRAC. Pour répondre à cette hypothèse, nous

pourrions fusionner ces  $V_{\text{H}}\text{H}$  à une molécule de biotine *in vivo* ou sous la forme bivalente fusionnée à la phosphatase alcaline pour la capture de nouveaux tests ELISA (Fairhead & Howarth 2015 ; Liu et al 2015).

#### IV.4. Perspectives thérapeutiques

Les anticorps monoclonaux ont démontré des résultats prometteurs en tant que potentiels agents thérapeutiques dans le modèle animal tels que l'élimination de tumeurs, traitement de maladies auto-immunes ou encore induction de la guérison contre une toxicité aiguë déclenchée par des endotoxines par la neutralisation de l'antigène ou par l'induction d'une réponse immunitaire chez l'hôte de type ADCC : *Antibody dependent cell mediated cytotoxicity* ou CDC : *Complement dependent cytotoxicity* (Bell et al 2010 ; Parsons et al 2018) bien que de nombreux essais effectués chez l'Homme ont montré les limites d'utilisation de ces anticorps « en l'état ». La principale raison est l'immunogénicité de ces anticorps qui déclenche une réaction immunitaire conduisant à l'élimination des anticorps et pouvant entraîner des effets indésirables graves liés à des actions directes sur les cellules du système immunitaire (Harding et al 2010). Pourtant, grâce aux avancées biotechnologiques des premiers succès ont vu le jour comme : (i) le Trastuzumab, indiqué pour des formes agressives et métastatiques du cancer du sein, un AcM humanisé anti-HER2 (*epidermal growth factor receptor 2*) obtenu après insertion des séquences CDR d'un AcM anti-HER2 obtenu chez la souris dans les régions FR d'une immunoglobuline de type IgG1 humaines (Albanell et al 2003), (ii) le Certolizumab, la partie Fab d'un AcM humanisé dirigée contre le TNF (Tumeur Necrosis Factor) indiqué dans les formes modérées et sévères de la Maladie de Crohn (Hanauer et al 2006). Les techniques particulièrement utilisées pour « humaniser » des AcM afin de diminuer leur immunogénicité sont la technique de *Phage Display* qui permet de cribler les séquences  $V_{\text{L}}$  et  $V_{\text{H}}$  humaines diriger contre l'antigène d'intérêt (Smith GP 1985 ; Malher SM et al 1997) ou l'utilisation de souris transgéniques « humanisées » comportant dans leurs génomes les gènes codant pour les immunoglobulines humaines (Jakobovits et al 2007). Par génie génétique, la séquence en acides aminés des AcM peut être modifiée pour augmenter leur affinité et/ou leur spécificité. Des anticorps recombinants de plus petites tailles correspondant à des fractions reconnaissant l'antigène de l'immunoglobuline d'intérêt (Fab, scFv) peuvent être élaborés et permettre ainsi (i) d'augmenter leur capacité de pénétration dans les tissus denses, (ii) de les fusionner avec des molécules rapporteuses (isotopes, enzymes) utilisées en imagerie médicale, à des agents cytotoxiques dans un objectif thérapeutique ou encore fusionnés à un peptide signal (i.e. *transbodies*) ou bien directement exprimés de façon intracellulaire (i.e. *intrabodies*) permettant leur expression et action au niveau intracellulaire (Nelson AL 2010 ; Lo et al 2008 ; Marasco 1999).

Le  $V_{\text{H}}\text{H}$  utilisé seul peut être un facteur limitant en tant qu'outil thérapeutique car sa petite taille fait qu'il est rapidement éliminé de la circulation. De plus, de part le manque du domaine Fc, il ne peut pas engendrer une réponse faisant intervenir d'autres cellules du système immunitaire de type ADCC ou CDC (Bell et al 2010 ; Parsons et al 2018). Bien que certaines études ont montré que la fixation de  $V_{\text{H}}\text{H}$  sous forme mono, bi ou trivalente à des épitopes ou récepteurs membranaires permettait d'inhiber la croissance de cellules tumorales

ou de neutraliser la réplication virale, des nouvelles technologies ont été développés afin d'être utilisées en tant qu'outils thérapeutiques (Roovers et al 2011 ; Detalle et al 2015).

Les *intrabodies* sont des anticorps recombinants modifiés de façon à ce qu'ils soient exprimés à l'intérieur d'une cellule (cytoplasme ou noyau) afin de reconnaître et à de se fixer sur un antigène intracellulaire (Chen et al 1994). Pour cela, les gènes codant pour ces anticorps modifiés peuvent être exprimés à l'intérieur de la cellule par des techniques de thérapie génique ou chez des animaux transgéniques (Marschall et al 2014). Les premiers anticorps recombinants à avoir été générés en tant qu'*intrabodies* sont des fragments des immunoglobulines de type scFv. Aujourd'hui, de nombreux V<sub>H</sub>H ont été développés car à l'inverse des scFv, la plupart conserve leur propriété de liaison à l'antigène même dans un environnement réducteur, tel que le cytoplasme d'une cellule procaryote ou eucaryote (Helma et al 2015 ; Marschall et al 2015). De nombreuses études *in vitro* ont démontré qu'il était possible d'inactiver l'expression et/ou la production d'enzymes telles que des kinases, des protéines oncogéniques, des toxines bactériennes ou de protéines virales au niveau intracellulaire grâce à l'expression de V<sub>H</sub>H spécifiques exprimés dans un compartiment des cellules cibles après transfection de ces dernières par des vecteurs d'expression contenant les séquences des V<sub>H</sub>H d'intérêt (Jimenez et al 2015 ; Summanen et al 2012 ; Alzogaray et al 2011 ; Boons et al 2014). D'autres systèmes, très utilisés en thérapie génique, ont été testés tels que l'utilisation de lentivirus ou d'adénovirus génétiquement modifiés, c'est à dire contenant la séquence du V<sub>H</sub>H d'intérêt, même si leur utilisation chez l'Homme n'a pas encore été approuvée (Waehler et al 2007 ; Goyvaerts et al 2012).

Récemment, des résultats prometteurs contre le virus de l'hépatite C humaine (VHC) ont été obtenus grâce à l'utilisation de *transbodies*. Des V<sub>H</sub>H fusionnés à une petite séquence peptidique ont permis leur translocation à travers la membrane plasmique et leur internalisation dans le cytoplasme des cellules infectées par le VHC (Thueng-in et al 2012 ; Jittavisutthikul et al 2015). Le sous-clonage a été réalisé à partir de séquences V<sub>H</sub>H humanisées, dirigées soit contre une polymérase de l'ARN soit contre une protéase à sérine, dans un vecteur plasmidique permettant la fusion avec une séquence peptidique de 16 acides aminés la *penetratin* (Poungpair et al 2010). Les résultats ont montré une inhibition directe et/ou une inhibition de la réplication de ces deux enzymes virales *in vitro*. Par ailleurs, pour des raisons de sécurité et d'éthique, les *transbodies* présentent l'avantage d'avoir une durée d'action limitée à l'inverse des *intrabodies* qui pourraient générer des altérations génétiques permanentes (Heng & Cao 2005).

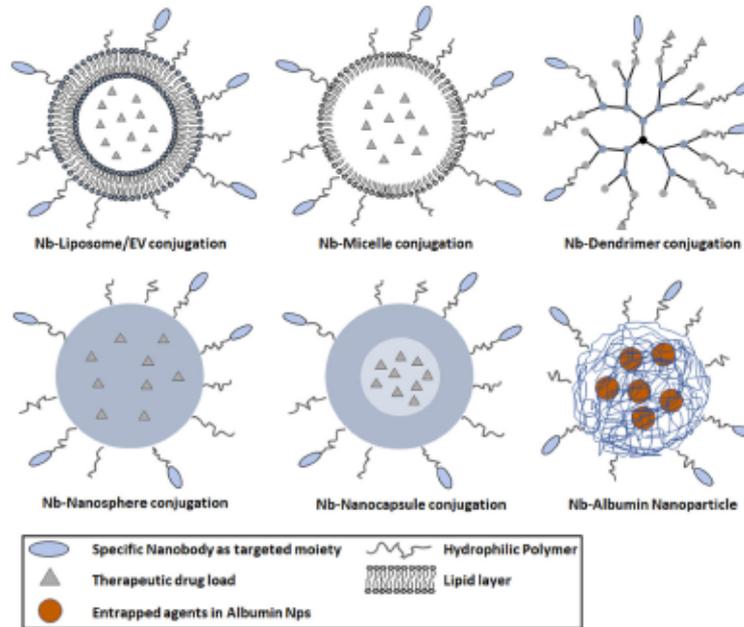
Par ailleurs, le développement de nanoparticules « NP » (voir Figure 19), présentant à leur surface des V<sub>H</sub>H principalement dirigés contre des récepteurs membranaires et contenant des molécules chimiothérapeutiques ont montré un transport et une internalisation plus ciblés de ces dernières dans les tissus cibles (Van der Meel et al 2012 ; Talelli et al 2013). De plus, le couplage à la surface de ces NP avec des molécules PEG a montré une augmentation de la biodisponibilité concomitante à une diminution de la rétention au niveau du foie (Suk et al 2016). En fonction du type de nanoparticules utilisés (liposomes, micelles, nanosphères ou nanocapsules), le contenu transporté peut être de nature hydrophile ou hydrophobe. Les

propriétés pharmacocinétiques et de biodistribution au niveau d'un tissu particulier peut différer d'une NP à l'autre (Steichen et al 2013).

Il serait intéressant, d'un point de vue thérapeutique, de tester le potentiel des AcM et des V<sub>H</sub>H développés et dirigés contre la TcPRAC. *In vitro*, par des tests de racémisation, ces anticorps sont-ils capables d'inhiber l'activité enzymatique de la TcPRAC recombinante ? Si oui, les épitopes reconnus sont certainement situés au niveau du site actif, ou au niveau des résidus avoisinants. Si non, il serait intéressant de cribler les différents clones V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC obtenus en fonction de leur capacité à inhiber l'activité enzymatique, et non pas, comme cela a été fait, vis à vis de leur affinité pour l'antigène obtenu par un test ELISA.

A partir de clone(s) V<sub>H</sub>H anti-TcPRAC capable(s) d'inhiber l'activité enzymatique, il serait envisageable de réaliser de nouvelles constructions plasmidiques permettant soit leur production et expression sous la forme d'*intrabody* par thérapie génique, soit leur production sous la forme de *transbody* par génie génétique. Ces deux types d'anticorps pourraient ainsi être testés par leur capacité à inhiber la croissance, via l'inhibition de la TcPRAC intracellulaire, du parasite de culture ou sur les formes amastigotes intracellulaires dans un modèle d'infection cellulaire *in vitro*. Il serait également possible de tester l'action de molécules potentiellement inhibitrices (dont le NG-P27) dans un système utilisant des nanoparticules et/ou pourquoi pas de mettre au point un test relevant pour le criblage de nouveaux inhibiteurs potentiels.

*In vivo*, dans le modèle expérimental murin, nous pourrions également tester (i) les AcM anti-TcPRAC de part leur capacité à induire une réponse de type ADCC et/ou CDC après leur fixation sur la TcPRAC membranaire (ii) des constructions de V<sub>H</sub>H bivalents anti-TcPRAC et anti-albumine afin d'augmenter leur biodisponibilité, et fusionnés à un fragment Fc, en sachant que la taille de ces anticorps recombinants serait moins élevée que leurs équivalents monoclonaux et donc susceptibles de mieux pénétrer dans les tissus et/ou de reconnaître des épitopes moins accessibles.



**Figure 19 :** Schémas représentant différents types de nanoparticules présentant à leur surface des V<sub>H</sub>H (i.e. Nb) dirigés contre l'antigène d'intérêt. Les différentes nanoparticules sont représentées des liposomes (100 à 400 nm), des micelles (10 à 100 nm), des dendrimères (3 à 20 nm), des nanosphères (1 à 100 nm) et des nanocapsules (10 à 1000 nm). Les parties bleues des nanoparticules de type polymérique représentent la matrice solide hydrophobe (nanosphère) présentant un cœur aqueux pour les nanocapsules. Les nanosphères et les nanocapsules peuvent encapsuler des molécules hydrophobes ou hydrophiles, respectivement. Extrait de *Frontiers in Immunology*. Hu Y. et al (2017).

#### IV.5. Conclusion finale

Les difficultés diagnostiques pour la Maladie de Chagas sont principalement dues au fait que le parasite est quasi-absent de la circulation périphérique pendant la phase chronique et donc la détection directe de ce dernier reste un obstacle. C'est pourquoi, encore aujourd'hui, les tests sérologiques indirects restent le « standard » pour affirmer si une personne est infectée ou non par *Trypanosoma cruzi*. Pourtant, les taux d'anticorps circulants dirigés contre les antigènes parasitaires principaux ou immunodominants sont détectables pendant plusieurs années et ne reflètent pas l'état d'avancement ou pas de la Maladie.

L'utilisation d'un marqueur spécifique parasitaire, telle que la TcPRAC, en plus de son utilité diagnostique, permettrait également d'apporter des informations supplémentaires importantes telles que (i) la présence du parasite (ii) l'estimation de la charge parasitaire et/ou la localisation du parasite (iii) l'apport de réponses plus précoces quant à l'efficacité d'un traitement antiparasitaire. Les améliorations technologiques et/ou l'apport de techniques de concentration ou encore la découverte d'autres marqueurs parasitaires plus exprimés pourraient permettre d'augmenter la sensibilité des tests et ainsi conforter les résultats.

Les publications scientifiques citant les *nanobodies* sont de plus en plus nombreuses et semblent mettre en avant un avenir prometteur concernant le diagnostique et les applications dans le domaine de la thérapeutique en « surpassant » entre autre l'immunothérapie « classique » qui utilise les AcM.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## A

Abulrob A, Sprong H, Van Bergen en Henegouwen P, Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmembrane single domain antibody : mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.* 2005 ; 95:1201–1214.

Albanell J, Codony J, Rovira A et al. Mechanism of action of anti-HER2 monoclonal antibodies: scientific update on trastuzumab and 2C4. *Adv Exp Med Biol.* 2003 ; 532:253-268.

Albertti LA, Macedo AM, Chiari E, Andrews NW, Andrade LO. Role of host lysosomal associated membrane protein (LAMP) in *Trypanosoma cruzi* invasion and intracellular development. *Microbes Infect.* 2010 ; 12(10): 784-789.

Aliberti JC, Cardoso MA, Martins GA, Gazzinelli RT, Vieira LQ, Silva JS. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun.* 1996 ; 64(6):1961-1967.

Alvarez MN, Peluffo G, Piacenza L, Radi R. Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J Biol Chem.* 2011 ; 286(8):6627-6640.

Alzogaray V, Danquah W, Aguirre A, Urrutia M. Single-domain llama antibodies as specific intracellular inhibitors of SpvB, the actin ADP-ribosylating toxin of *Salmonella typhimurium*. *FASEB J.* 25:526-534.

Andrews NW. The acid-active hemolysin of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol.* 1990 ; 71:241-244.

Antas PR, Medrano-Mercado N, Torrico F, Ugarte-Fernandez R et al. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *Am J Trop Med Hyg.* 1999 ; 61:308-314.

Araujo-Jorge TC, Waghbi MC, Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS et al. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardial pathology. *J Infect Dis.* 2002 ; 186(12):1823-1828.

Ardekani LS, Gargari SLM, Rasooli I, Bazi MR, Mohammadi M, et al. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int J Inf Dis.* 2013 ; 17:723-728.

## B

Bafica A, Santiago HC, Goldszmid R, Ropert C, Gazzinelli RT, Sher A. Cutting edge : TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependant control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2006; 177(6):2515-3519.

Bala G, Blykers A, Xavier C, Descamps B et al. Targeting of vascular cell adhesion molecule-1 by 18F-labeled nanobodies for PET/CT imaging of inflamed atherosclerotic plaques. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2016 ; 17(9):1001-1008.

Bannas P, Hambach J, Koch-Nolte F. Nanobodies and nanobody-based human heavy chain antibodies as antitumor therapeutics. *Front Immunol.* 2017;8:1603.

Bartholomeu DC, Cerqueira GC, Leao AC, daRocha WD et al. Genomic organization and expression profile of the mucin-associated surface protein (masp) family of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Nucleic Acids Res.* 2009 ; 37(10):3407-3417.

Barry JD, Marcello L, Morrison LJ et al. What the genome sequence is revealing about trypanosome antigenic variation. *Biochem Soc Trans.* 2005 ; 33:986-989.

- Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* 2007 ; 7(11):875-888.
- Bell A, Wang ZJ, Arbabi-Ghahroubi M, Chang TA et al. Differential tumor-targeting abilities of three single-domain antibody formats. *Cancer Lett.* 2010 ; 289(1):81-90.
- Bermejo DA, Amezcua Vesely MC, Khan M, Acosta Rodriguez EV, Montes CL et al. Trypanosoma cruzi infection induces a massive extrafollicular and follicular splenic B-cell response which is a highly source of non-parasite-specific antibodies. *Immunology.* 2011 ; 132(1):123-133.
- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2009 ; 49:52-54.
- Berneman A, Montout L, Goyard S, Chamond N, Cosson A, d'Archivio S, Gouault N et al. Combined approaches for drug design points the way to novel proline racemase inhibitor candidates to fight Chagas' disease. *PLoS One.* 2013 ; 8(4):e60955.
- Beucher M, Norris KA. Sequence diversity of the Trypanosoma cruzi complement regulatory protein family. *Infect Immun.* 2008 ; 76(2):750-758.
- Bever CS, Dong JX, Vasylieva N, Barnych B et al. VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals. *Anal Bioanal Chem.* 2016 ; 408(22):5985-6002.
- Boado RJ, Hui EKW, Lu JZ, Sumbria RK, Pardridge WM. Blood-brain barrier molecular Trojan horse enables imaging of brain uptake of radioiodinated recombinant protein in the rhesus monkey. *Bioconjug Chem.* 2013 ; 24:1741-1749.
- Boons E, Li G, Vanstreels E, Vercruyse T et al. A stably expressed llama single-domain intrabody targeting Rev displays broad-spectrum anti-HIV activity. *Antiviral Res.* 2014 ; 112:91-102.
- Borda E, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R et al. A circulating IgG in chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol.* 1984 ; 57(3):679-686.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand Trypanosoma cruzi strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 ; 10(8) : e0004792.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six Trypanosoma cruzi lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000 ; 111:95-105.
- Britto C, Cardoso A, Silveira C, Macedo V, Fernandes O. Polymerase chain reaction (PCR) as a laboratory tool for the evaluation of the parasitological cure in Chagas disease after specific treatment. *Medicina (B Aires).* 1999 ; 59(2):176-178.
- Brumpt E. Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier de la trypanosome de Chagas. *Bull Soc Pathol Exot.* 1914 ; VII(10):706-710.
- Burleigh BA, Andrews NW. The mechanisms of Trypanosoma cruzi invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol.* 1995 ; 49:175-200.
- Burns JM Jr, Shreffler WG, Rosman DE, Sleath PR, March CJ, Reed SG. Identification and synthesis of a major conserved antigenic epitope of Trypanosoma cruzi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 ; 89:1239-1243.
- Buscaglia CA, Campo VA, Frasch AC, Di Noia JM. Trypanosoma cruzi surface mucins: host-dependent coat diversity. *Nat Rev Microbiol.* 2006 ; 4(3):229-236.
- Buschiazzi A, Goytia M, Schaeffer F, Degraeve W, Shepard W et al. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of Trypanosoma cruzi proline racemase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 ; 103(6):1705-1710.

## C

Caballero ZC, Costa-Martins AG, Ferreira RC, P Alves JM et al. Phylogenetic and synthetic data support a single horizontal transference to a *Trypanosoma* ancestor of a prokaryotic proline racemase implicated in parasite evasion from host defences. *Parasit Vectors*. 2015 ; 8:122.

Caljon G, Cavelliers V, Lahoutte T, Stijlemans B, et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. *Br J Pharmacol*. 2012 ; 165:2341-2353.

Camargo MM, Almedia IC, Pereira MES, Ferguson M et al. Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immunol*. 1997 ; 158:5890-5901.

Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR et al. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxid synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol*. 1997 ; 159(12):6131-6139.

Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999 ; 94:331-335.

Cançado JR. Long term evaluation of etiologic treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002 ; 44(1):29-37.

Cano MI, Gruber A, Vazquez M, Cortes A, Levin JM et al. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mol Biochem Parasitol*. 1995; 71(2):273-278.

Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, et al. The United States *Trypanosoma cruzi* Infection Study: evidence for vector-borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. *Transfusion*. 2002 ; 52:1922-1930.

Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG, Silva JS. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10 : role of NK cells. *Infect Immun*. 1996; 64(1):128-134.

Cardillo F, de Pinho RT, Antas PR, Mengel J. Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. *Pathog Dis*. 2015 ; 73(9):ftv082.

Carlier Y, Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop*. 2015 ; 151:103-15.

Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, et al. Chagas' disease diagnosis : evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*. 1993 ; 33(10):830-834.

Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG et al. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2002 ; 88:894-900.

Cestari Idos S, Evans-Osses I, Freitas JC, Inal JM, Ramirez MI. Complement C2 receptor inhibitor trispanning confers an increased ability to resist complement-mediated lysis in *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 2008 ; 198(9):1276-1283.

Chagas C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.ge, n.sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. *Mem. Inst. Osw. Cruz*. 1909 ; 1:159-218.

Chamond N, Grégoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH et al. Biochemical characterization of proline racemase from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J Biol Chem.* 2003 ; 278(18):15484-15494.

Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A et al. *Trypanosoma cruzi* proline racemase are involved in parasite differentiation and infectivity. *Mol Microbiol.* 2005 ; 58(1):46-60.

Chatalic KL, Veldhoven-Zweistra J, Bolkestein M et al. A novel <sup>111</sup>In-labeled anti-prostate-specific membrane antigen nanobody for targeted SPECT/CT imaging of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2015 ; 56(7) :1094-1099.

Chen J, He QH, Xu Y, Fu JH et al. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. *Talanta.* 2016 ; 147:523-530.

Chen SY, Bagley J, Marasco WA. Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gen Ther.* 5(5):595-601.

Combs TP, Nagajyothi, Mukherjee S, de Almeida CJ, Jelicks LA, et al. The adipocyte as an important target cell for *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem.* 2005 ; 280:24085-24094

Cordeiro FD, Martins-Filho OA, Da Costa Rocha MO, Adad SJ et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001 ; 8(1):112-118.

Cortez-Retamozo VLT, Caveliers V, Gainkam LOT, Heriot S. <sup>99m</sup>Tc-labeled Nanobodies: a new type of targeted probes for imaging antigen expression. *Current Radiopharm.* 2008 ; 1:37-41.

Cotrim PC, Paranhos GS, Mortara RA, Wanderley J, et al. Expression in *Escherichia coli* of a dominant immunogen of *Trypanosoma cruzi* recognized by human chagasic sera. *J Clin Microbiol.* 1990 ; 28:519-524.

Cotrim PC, Paranhos-Baccala G, Santos MR, Mortensen C et al. Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoskeleton of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1995 ; 71(1):89-98.

Coura JR, Vinas PA. Chagas disease : a new worldwide challenge. *Nature.* 2010 ; 465 (7301):S6-7.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy : biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 ; 92:3541-2545.

## D

D'Avila DA, Guedes PMM, Castro AM, Gontijo ED et al. Immunological imbalance between IFN- $\gamma$  and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009 ; 104:100-105.

D'Imerio Lima MR, Eisen H, Minoprio P, Joskowicz M, Coutinho A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 1986 ; 137:353-356.

Da Matta Guedes PM, Gutierrez FR, Maia FL, Milanezi CM, Silva GK et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 ; 4(2):e604.

Da Silva AC, Espinoza AG, Taibi A, Ouaisi A, Minoprio P. A 24.000 MW Trypanosoma cruzi antigen is a B-cell activator. *Immunology*. 1998 ; 94:189-196.

Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease : recombinant Trypanosoma cruzi antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol*. 2001 ; 17:286-291.

De Araujo FF, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Antas PR et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 ; 5(5):e992.

De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S & Wyns L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 ; 103:4586-4591.

De Kleijn D, Pasterkamp G. Toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res*. 2003 ; 60(1):58-67.

De Meyer T, Muyldermans J, Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol*. 2014 ; 32:263-270.

De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 ; 41(10):2069-2080.

Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 ; 60(1):6-13.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiatives). Responding to neglected patient needs through innovation. *Annual Report*. 2017.

Dona V, Urrutia M, Bayardo M, Alzogaray V, Goldbaum FA, Chirido FG. Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *J Agric Food Chem*. 2010 ; 58:918-926.

Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 ; 3(4):e419.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cancado JR, Pinto-Dias JC et al. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol*. 1994 ; 6:499-506.

## E

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D et al. The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiological agent of Chagas disease. *Science*. 2005 ; 309:409-415.

Engstler M, Pfohl T, Herminghaus S et al. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell*. 2007 ; 131:505-515.

Even-Desrumeaux K, Baty D, Chames P. Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation. *Mol Biosyst*. 2010 ; 6:2241-2248.

## F

Fairhead M, Howarth M. Site-specific biotinylation of purified proteins using BirA. *Methods Mol Biol*. 2015 ; 1266:171-184.

Fanning SW, Horn JR. An anti-hapten camelid antibody reveals a cryptic binding site with significant energetic contributions from a nonhypervariable loop. *Protein Sci*. 2011 ; 20:1196-1207.

Fatima A, Wang H, Kang K, Xia L, Wang Y, et al. Development of VHH Antibodies against Dengue Virus type 2 NS1 and comparison with Monoclonal Antibodies for use in immunological diagnosis. *PLoS One*. 2014 ; 9:e95263.

Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB et al. Efficacy of benznidazole treatment of asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 ; 104:27-32.

Fernandez-Villegas A, Pinazo MJ, Maranon C, Thomas MC, Posada E et al. Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect Dis*. 2011 ; 11:206.

Ferreira AV, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C et al. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect*. 2011 ; 13:1002-1005.

Ferreira V, Valck C, Sanchez G, Gingras A et al. The classical activation pathway of the human complement system is specifically inhibited by calreticulin from *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 2004 ; 172(5):3042-3050.

Field MC, Carrington M. The trypanosome flagellar pocket. *Nat Rev Microbiol*. 2009 ; 7(11):775-786.

Fischer E, Ouaisi MA, Velge P, Cornette J, Kazatchkine MD. gp 58/68, a parasite component that contributes to the escape of the trypomastigote form of *T. cruzi* from damage by the human alternative complement pathway. *Immunology*. 1988 ; 65(2):299-303.

Freilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1983 ; 18 : 325-330.

Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease : diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*. 1995 ; 21:551-555.

Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly. *Annu Rev Physiol*. 2003 ; 65:45-79.

Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem*. 1995 ; 64:97-112.

## G

Galvao LM, Nunes RM, Cançado JR, Brener Z, Krettli AU. Lytic antibody titre as means of assessing cure after treatment of Chagas disease: a 10 years follow-up study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993 ; 87(2):220-223.

Gao W, Wortis HH, Pereira MA. The *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase is a T cell-independent B cell mitogen and an inducer of non-specific Ig secretion. *Int Immunol*. 2002 ; 14:299-308.

Garza JA, Taylor AB, Sherwood LJ, Hart PJ, Hayhurst A. Unveiling a drift resistant cryptotope within Marburgvirus nucleoprotein recognized by llama single-domain antibodies. *Front Immunol*. 2017 ; 8:1234.

Gazzinelli RT, Peireira ME, Romanha A, Gazzinelli G, Brener Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: a novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunol*. 1991 ; 13:345-356.

Gomes JA, Bahia-Oliveira LM, Rocha MO, Martins-Filho OA et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*. 2003 ; 71:1185-1193.

Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease : what has been achieved ? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies ? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 ; 104 : 115-121.

Gonzales-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S. Single-domain antibodies as versatile affinity reagents for analytical and diagnostic applications. *Front. Immunol.* 2017 ; 8:977.

Goytia M, Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Hermant D et al. Molecular and structural discrimination of proline racemase and hydroxyproline-2-epimerase from nosocomial and bacterial pathogens. *PLoS One.* 2007 ; 2(9):e885.

Goyvaerts C, De Groeve K, Dingemans J, Van Lint S et al. Development of the nanobody display technology to target lentiviral vectors to antigen-presenting cells. *Gene Ther.* 2012 ; 19(12):1133-1140.

Granjon E, Dichtel-Danjoy ML, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L, Zrein M. Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 ; 10(4):e0004596.

## H

Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993 ; 363:446-448.

Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology.* 2006 ; 130(2):323-333.

Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies. *mAbs.* 2010 ; 2(3):256-265.

Harding J, Burtess B. Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs Today.* 2005 ; 41:107-127.

Hardison JL, Wrightsman RA, Carpenter PM, Lane TE, Manning JE. The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 2006 ; 74(1):125-134.

Harmsen MM, Fijten HPD. Improved functional immobilization of llama single-domain antibody fragments to polystyrene surfaces using small peptides. *J Immunoassay Immunochem.* 2012 ; 33:234-251.

He T, Wang Y, Li P, Zhang Q, Lei J, et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for aflatoxin in agro-products with high tolerance to cosolvent methanol. *Anal Chem.* 2014 ; 86:8873-8880.

Helma J, Cardoso MC, Muyldermans S, Leonhardt H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J Cell Biol.* 2015 ; 209:633-644.

Heng BC, Cao T. Making cell-permeable antibodies (Transbody) through fusion of protein transduction domains (PTD) with single chain variable fragment (scFv) antibodies: potential advantages over antibodies expressed within the intracellular environment (Intrabody). *Med Hypotheses.* 2005 ; 64(6):1105-1108.

Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today.* 1996 ; 12:108-114.

Henriksson J, Dujardin JC, Barnabe C, Brisse S et al. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology.* 2002 ; 124:277-286.

Herce HD, Garcia AE. Molecular dynamics simulations suggest a mechanism for translocation of the HIV-1 TAT peptide across lipid membranes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 ; 104:20805-20810.

Hernandez P, Heimann M, Riera C, Solano M, et al. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 ; 17:1598-1604.

Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic human, Chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997 ; 56(5):485-489.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* 1966 ; 212:1385-1386.

Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, et al. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis.* 1999 ; 179:1226-34.

Hu Y, Liu C, Muylldermans S. Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy. *Front Immunol.* 2017 ; 8:1442.

## I

Ibanez CF, Affranchino JL, Frasch AC. Antigenic determinants of *Trypanosoma cruzi* defined by cloning of parasite DNA. *Mol Biochem Parasitol.* 1987 ; 25:175-184.

Iqbal N, Iqbal N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: overexpression and therapeutic implications. *Mol Biol Int.* 2014 ; 2014:852748.

## J

Jakobovits A, Amado RG, Yang X, Roskos L, Schwab G. From XenoMouse technology to panitumumab, the first fully human antibody product from transgenic mice. *Nat Biotechnol.* 2007 ; 25:1134-1143.

Jimenez JI, Fraile S, Zafra O, de Lorenzo V. Phenotypic knockouts of selected metabolic pathways by targeting enzymes with camel-derived nanobodies (VHHs). *Metab Eng.* 2015; 30:40-48.

Jittavisutthikul S, Thanongsaksrikul J, Thueng-In K et al. Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication. *Viruses.* 2015 ; 7(4):2030-2056.

## K

Kandalaft H, Hussack G, Aubry A, Van Faassen H, et al. Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015 ; 99:8549-8562.

Kayama H, Takeda K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Microbes Infect.* 2010 ; 12(7):511-517.

Kijanka M, Warnders FJ, El Khattabi M, Lub-de Hooge M et al. Rapid optical imaging of human breast cancer tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2013 ; 40:1718-1729.

Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34(5):1171-1175.

Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975 ; 256:495-497.

Kohler G, Milstein C. Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol.* 1976 ; 6:511-519.

Kollien AH, Schaub GA. Development of *Trypanosoma cruzi* after starvation and feeding of the vector – a review. *Tokai J Exp Clin Med.* 1998 ; 23(6):335-340.

Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000 ; 16(9):381-387.

Krautz GM, Galvao LM, Cancado JR, Guevara-Espinoza A et al. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas disease. *J Clin Microbiol*. 1995 ; 33:2086-2090.

Kress Y, Bloom BR, Whitner M, Rowen A and Tanowitz H. Resistance of *Trypanosoma cruzi* to killing by macrophages. *Nature*. 257:394-396.

Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*. 1976 ; 116(3):755-760.

Krettli AU. The utility of anti-trypomastigote lytic antibodies for determining cure of *Trypanosoma cruzi* infections in treated patients: an overview and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 ; 104(1):142-151.

Krūwel T, Nevoltris D, Bode J, Dullin C, Baty D, Chames P, Alves F. In vivo detection of small tumour lesions by multi-pinhole SPECT applying a (99m)Tc-labelled nanobody targeting the Epidermal Growth Factor Receptor. *Sci Rep*. 2016 ; 6:21834.

Kwon S, Davies-Venn C, Sevvick-Muraca EM. In vivo dynamic imaging of intestinal motions using diet-related autofluorescence. *Neurogastroenterol Motil*. 2012 ; 24(5):494-97.

## L

Lafaye P, Nato F, Mazié JC, Doyen N. Similar binding properties for a neutralizing anti-tetanus toxoid human monoclonal antibody and its bacterially expressed Fab. *Res Immunol*. 1995 ; 146(6):373-382.

Lafaye P, Chmielewski V, Nato F, Mazié JC, Morfin R. The 7 $\alpha$ -hydroxysteroids produced in human tonsils enhance the immune response to tetanus toxoid and *Bordetella pertussis* antigens. *Biochim Biophys Acta*. 1999 ; 1472(1-2):222-231.

Lafaye P, Achour I, England P, Duyckaerts C, Rougeon F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent A $\beta$ -induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol Immunol*. 2009 ; 46:695-704.

Landenson RC, Crimmins DL, Landt Y, Landenson JH. Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. *Anal Chem*. 2006 ; 78:4501-4508.

Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W et al. Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J*. 1998 ; 17:3512-3520.

Leite-de-Moraes M, Coutinho A, Hontebeyrie-Joskowicz M et al. Skewed V beta TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Int Immunol*. 1994 ; 6:387-392.

Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol*. 2014 ; 16(9):1285-1300.

Li M, Zhu M, Zhang C, Liu X, Wan Y. Uniform orientation of biotinylated nanobody as an affinity binder for detection of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin. *Toxins*. 2014 ; 6(12):3208-3222.

Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*. 2007 ; 4(3):251-256.

Li T, Bourgeois JP, Celli S, Glacial F, Le Sourd AM, Mecheri S et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes : applications to brain imaging. *FASEB J*. 2012 ; (10):3969-3979.

Li T, Vandesquille M, Koukouli F, Duffeffant C, Youssef I, Lenormand P, et al. Camelids single-domain antibodies : a versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J Control Release*. 2016 ; 243:1-10.

Liu X, Xu Y, Wan D, Xiong Y et al. Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin A in cereal. *Anal Chem*. 2015 ; 87:1387-1394.

Lo AS, Zhu Q, Marasco WA. Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol*. 2008 ; 181:343-373.

Luz ZM, Coutinho MG, Cançado JR, Krettli AU. Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1994; 27(3):143-148.

## M

Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR et al. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 2005 ; 191(4):627-636.

Magalhaes LM, Villani FN, Nunes MC, Gollob KJ, Rocha MO, Dutra WO. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. *J Infect Dis*. 2013 ; 207:661-665.

Mahler SM, Marquis CP, Brown G et al. Cloning and expression of human V-genes derived from phage display libraries as fully assembled human anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibodies. *Immunotechnology*. 1997 ; 3:31-43.

Marasco WA, LaVecchio J, Winkler A. Human anti-HIV-A tat sFv intrabodies for gene therapy of advanced HIV-1-infection and AIDS. *J Immunol Methods*. 1999 ; 231(1-2):223-238.

Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation*. 2007 ; 115(9):1109-1123.

Marino AP, da Silva A, dos Santos P, Pinto LM et al. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation*. 2004 ; 110(11):1443-1449.

Marschall AL, Single FN, Schalarman K, Bosio A et al. Functional knock down of VCAM1 in mice mediated by endoplasmic reticulum retained intrabodies. *MAbs*. 2014 ; 6(6):1394-1401.

Marschall AL, Dubel S, Boldicke T. Specific in vivo knockdown of protein function by intrabodies. *MAbs*. 2015 ; 7:1010-1035.

Martin D, Tarleton R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev*. 2004 ; 201:304-317.

Mateo H, Marin C, Perez-Cordon G, Sanchez-Moreno M. Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2008 ; 103(3):271-276.

McKeating JA, Shotton C, Cordell J, Graham S et al. Characterization of neutralizing monoclonal antibodies to linear and conformation-dependent epitopes within the first and second variable domains of human immunodeficiency virus type 1 gp120. *J Virol*. 1993 ; 67(8):4932-4944.

Meira WSF, Galvao LMC, Gontijo ED, Machado-Coelho GLL et al. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *J Clin Microbiol*. 2004 ; 42:707-712.

Messenger LA, Miles MA. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2015 ; 151:150-155.

Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, et al. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978 ; 272:819-821.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L et al. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantification of both T-and B-cell responses. *Scand J Immunol.* 1986 ; 24(6):661-668.

Minoprio P, Burlen O, Pereira P, Guilbert B et al. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol.* 1988 ; 28:553-561.

Minoprio P, Bandeira A, Pereira P, Mota Santos T, Coutinho A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol.* 1989 ; 1:176-184.

Montes CL, Zuniga EI, Vasquez J, Arce C, Gruppi A. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial malate dehydrogenase triggers polyclonal B-cell activation. *Clin Exp Immunol.* 2002 ; 127:27-36.

Montes CL, Acosta-Rodriguez EV, Mucci J et al. *Trypanosoma cruzi* antigen signals CD11b+ cells to secrete cytokines that promote polyclonal B cell proliferation and differentiation into antibody-secreting cells. *Eur J Immunol.* 2006 ; 36:1474-1485.

Morrison LJ, Marcello L, McCulloh R. Antigenic variation in the African trypanosome: molecular mechanisms and phenotypic complexity. *Cell Microbiol.* 2009 ; 11:1724-1734.

Moser DR, Kirchhoff LV et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989 ; 27(7):1477-1482.

Munoz-Fernandez MA, Fernandez MA, Fresno M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. *Immunol Lett.* 1992 ; 33(1):35-40.

Murcia L, Carrilero B, Munoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* 2010 ; 65:1759-1764.

Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng.* 1994 ; 7:1129-1135.

Muyldermans S, Baral TN, Retamozzo VC, De Baetselier P, De Genst E et al. Camelid immunoglobulins and nanobody technology. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009 ; 128:178-183.

Muyldermans S. Nanobodies : natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013 ; 82:775-797.

## N

Nabuurs RJ, Rutgers KS, Welling MM, Metaxas A et al. In vivo detection of amyloid-beta deposits using heavy chain antibody fragments in a transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *PLoS One.* 2012 ; 7(6):e38284.

Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Schefer PE et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell Microbiol.* 2012 ; 14:634-643

Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms underlying the action and synergism of Trastuzumab and Pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel).* 2018 ; 10(10).Pii:E242.

Nelson AL. Antibody fragments, hope and hype. *Mabs*. 2010 ; 2(1):77-83.

Nihei J, Cardillo F, Dos Santos WL, Pontes-de-Carvalho L, Mengel J. Administration of a nondepleting anti-CD25 monoclonal antibody reduces disease severity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Microbiol Immunol*. 2014 ; 4(2):128-137.

Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J Immunol*. 1991 ; 147(7):2240-2247.

Nunes LR, De Carvalho MRC, Buck GA. *Trypanosoma cruzi* strains partition in two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol Biochem Parasitol*. 1997 ; 86:211-224.

## O

Oliveira AC, Peixoto JR, de Arruba LB, Campos MA, Gazzinelli RT et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoionositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol*. 2004 ; 173(9):5688-5696.

Oliveira S, Van Dongen GA, Stiger-van Walsum M, Roovers RC et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Mol Imaging*. 2012 ; 11:33-46.

Organisation mondiale de la Santé. Intégrer les maladies tropicales négligées dans l'action pour la santé mondiale et le développement : quatrième rapport de l'OMS sur les maladies tropicales négligées. 2017. Licence : CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

Osorio L, Rios I, Gutierrez B, Gonzales J. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? *Microbes Infect*. 2012 ; 14(15):1390-1402.

## P

Panza P, Maier J, Schmees C, Rothbauer U, Söllner C. Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. *Development*. 2015 ; 142:1879-1884.

Parsons MS, Chung AW, Kent SJ. Importance of Fc-mediated functions of anti-HIV-A broadly neutralizing antibodies. *Retrovirology*. 2018 ; 15(1):58.

Pepe SM, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML et al. Phases of biomarkers development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2001 ; 93:1054-1061.

Petersen CA, Burleigh BA. Role for interleukin-1 beta in *Trypanosoma cruzi*-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Infect Immun*. 2003 ; 71(8):4441-4447.

Peterson NC, Wilson GG, Huang Q, et al. Biodistribution analyses of a near-infrared, fluorescently labeled, bispecific monoclonal antibody using optical imaging. *Comp Med*. 2016 ; 66(2):90-99.

Piacenza L, Peluffo G, Alvarez MN, Kelly JM et al. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage and endogenously derived peroxynitrite. *Biochem J*. 2008 ; 410(2):359-368.

Piacenza L, Zago MP, Peluffo G, Alvarez MN et al. Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *Int J Parasitol*. 2009 ; 39(13):1455-1464.

Pinazo MJ, Thomas MC, Blua J, Perrone A, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Infect Ther*. 2014 ; 12(4):479-496.

Poungpair O, Pootong A, Maneewatch S, Srimanote P et al. A human single chain transbody specific to matrix protein (M1) interferes with the replication of influenza A virus. *Bioconjug Chem.* 2010 ; 21:1134-1141.

## Q

Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, Da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Dis.* 2012 ; 6(7):e1689.

## R

Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn.* 2015 ; 17(5):605-615.

Rashidian M, Keliher EJ, Bilate AM, Duarte Jn et al. Noninvasive imaging of immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015 ; 112(19):6146-6151.

Reina-San-Martin B, Degraeve W, Rougeot C, Cosson A, Chamond N et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med.* 2000 ; 6(8):890-897.

Requena-Méndez A, Lopez MC, Angheben A, Izquierdo L, et al. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2013 ; 11(9):957-976.

Roovers RC, Vosjan MJ, Laeremans T, el Khoulati R et al. A biparatopic anti-EGFR nanobody efficiently inhibits solid tumour growth. *Int J Cancer.* 2011 ; 129(8):2013-2024.

Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, et al. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Meths.* 2006 ; 3:887-889.

Rossi MA. The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease. *Int J Cardiol.* 1991 ; 30(3):335-340.

Rossotti MA, Pirez M, Gonzales-Techera A, Cui Y, Bever CS, Lee S, et al. Method for sorting and pairwise selection of nanobodies for the development of highly sensitive sandwich immunoassays. *Anal Chem.* 2015 ; 87:11907-11914.

## S

Sabir J S.M, Atef A, El-Domyati F.M, Edris S, et al. Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library. *C. R. Biologies.* 2014 ; 337:244-249.

Sackett DL, Haynes RB. The architect of diagnostic research. *BMJ.* 2002 ; 324(7336):539-541.

Saerens D, Frederik F, Reekmans G et al. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. *Anal Chem.* 2005 ; 77:7547-7555.

Saerens D, Stijlemans B, Baral TN, Nguyen Thi GT, Wernery U, Magez S et al. Parallel selection of multiple anti-infectosome nanobodies without access to purified antigens. *J Immunol Methods.* 2008 ; 329:138-150.

Saleem M, Kamal M. Monoclonal antibodies in clinical diagnosis: a brief review application. *African J Biotechnol.* 2008 ; 7(8):923-925.

Saraiva RM, Waghbi MC, Vilela MF, Madeira FS et al. Predictive value of transforming growth factor beta-1 in Chagas disease : towards a biomarker surrogate of clinical outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013 ; 107(8):518-525.

Siddiqui MZ. Monoclonal antibodies as diagnostics; an appraisal. *Indian J Pharm Sci.* 2010 ; 72(2):12-17.

Schmidt MM, Wittrup KD. A modeling analysis of the effects of molecular size and binding affinity on tumor targeting. *Mol Cancer Ther.* 8(10):2861-2871.

Silva JS, Twardzik DR, Reed SG. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 1991 ; 174(3):539-545.

Smith GP. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985 ; 228:1315-1317.

Soares RP, Torrecilhas AC, Assis RR, Rocha MN, Moura e Castro FA et al. Intraspecies variation in *Trypanosoma cruzi* GPI-mucins : biological activities and differential expression of alpha-galactosyl residues. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 ; 87(1):87-96.

Sosoniuk E, Vallejos G, Kenawy H, Gaboriaud C et al. *Trypanosoma cruzi* calreticulin inhibits the complement lectin pathway activation by direct interaction with L-ficolin. *Mol Immunol.* 2014 ; 60(1):80-85.

Sousa GR, Gomes JA, Fares RC, Damasio MP, Chaves AT, Ferreira KS et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. *PLoS One.* 2014 ; 9(3):e87082.

Souza PE, Rocha MO, Menezes CA, Coelho JS, Chaves AC et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. *Infect Immun.* 2007 ; 75:1886-1894.

Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996 ; 83:141-152.

Steichen SD, Caldorena-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for delivery of cancer therapeutics. *Eur J Pharm Sci.* 2013 ; 48(3):416-427.

Steindel M, Dias Neto E, de Menezes C, Romanha AJ, Simpson AJG. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol.* 1993 ; 60:71-80.

Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Van Xong H et al. Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm. *J Biol Chem.* 2004 ; 279(2):1256-1261.

Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Rev.* 2016 ; 99:28-51.

Summanen M, Granqvist N, Tuominen RK, Yliperttula M et al. Kinetics of PKCepsilon activating and inhibiting llama single chain antibodies and their effect on PKCepsilon translocation in HeLa cells. *PLoS One.* 2012 ; 7:e35630.

Swain MD, Anderson GP, Serrano-Gonzalez J, Liu JL et al. Immunodiagnostic reagents using llama single domain antibody-alkaline phosphatase fusion proteins. *Anal Biochem.* 2011 ; 417:188-194.

## T

Talelli M, Oliveira S, Rijcken CJ, Pieters EH et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy. *Biomaterials.* 2013 ; 34(4):1255-1260.

Talvani A, Ribeiro CS, Aliberti JC, Michailowsky V, Santos PV et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Microbes Infect.* 2000 ; 2(8):851-866.

Tambourgi DV, Kipnis TL, da Silva WD, Joiner KA et al. A partial cDNA clone of trypomastigote decay-accelerating factor (T-DAF), a developmentally regulated complement inhibitor of *Trypanosoma cruzi*, has genetic and functional similarities to the human complement inhibitor DAF. *Infect Immun.* 1993 ; 61(9):3656-3663.

Tanaka T, Lobato MN, Rabbitts TH. Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J Mol Biol.* 2003 ; 331(5):1109-1120.

Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM et al. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* 1992 ; 166:598-603.

Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 ; 5:e1136.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA et al. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. *Cell.* 1992 ; 71:1117-1130.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol.* 2007 ; 19(4):430-434.

Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Souza AO, Nilz N. Pathogenesis of chagas' disease : parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev.* 2011 ; 34(3) :592-630.

Thueng-in K, Thanongsaksrikul J, Srimanote P, Bangphoomi K et al. Cell penetrable humanized-VH/V(H)H that inhibit RNA dependent RNA polymerase (NS5B) of HCV. *PLoS One.* 2012 ; 7(11):e49254.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Nat Acad Sci USA.* 1986 ; 83:115-119.

Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Stigter Van Walsum M et al. Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor nanobodies through albumin: taking advantage of molecular nanobody technology. *Mol Cancer Ther.* 2008 ; 7(8):2288-2297.

## U

Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1996 ; 34:2143-2147.

## V

Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop.* 1999 ; 72:203-212.

Van Audenhove I, Gettemans J. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. *EBioMedicine.* 2016 ; 8:40-48.

Van Bockstaele F, Holz JB, Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr Opin Investig Drugs.* 2009 ; 10(11):1212-1224.

Van den Ent F, Lowe J. RF cloning : a restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *J Biochem Biophys Methods.* 2006 ; 67(1):67-74.

- Van der Linden RH, Frenken LG, De Geus B, Harmsen MM, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1999 ; 1431:37-46.
- Van de Meel R, Oliveira S, Altinhas I et al. Tumor-targeted nanobullets: anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment. *J Control Release*. 2012 ; 159(2):281-289.
- Vaneycken I, Devoogdt N, Van Gassen N, Vincke C et al. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J*. 2011 ; 25:2433-2446.
- Vasquez MP, Levin MJ. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene*. 1999 ; 239(1):217-225.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol*. 2004 ; 138:131-141.
- Vasconcelos RH, Amaral FN, Cavalcanti MG, Silva ED et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. *Hum Immunol*. 2010 ; 71(10):964-967.
- Verçosa AF, Lorena VM, Carvalho CL, Melo MF et al. Chagas' disease: IgG isotypes against cytoplasmic (CRA) and flagellar (FRA) recombinant repetitive antigens of *Trypanosoma cruzi* in chronic Chagasic patients. *J Clin Lab Anal*. 2007 ; 21(5):271-276.
- Vincke C, Muyldermans S. Introduction to heavy chain antibodies and derived Nanobodies. *Methods Mol Biol*. 2012 ; 911:15-26.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment : a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006 ; 144:724-734.
- Viotti R, Vigliano C, Alvarez MG et al. Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 ; 5(9):e1314.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 ; 68 (5) : 574-582.
- Vosjan MJ, Perk LR, Roovers RC, Visser GW, et al. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor nanobody with <sup>68</sup>Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 ; 38:753-763.
- Vosjan MJ, Vercammen J, Kolkman JA et al. Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. *Mol Cancer Ther*. 2012 ; 11(4):1017-1025.

## W

- Waehtler R, Russell SJ, Curiel DT. Engineering targeted viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*. 2007 ; 8(8):573-587.
- Waghbi MC, Keramidis M, Bailly S, Degraeve W, Mendonça-Lima L et al. Uptake of host cell transforming growth factor-beta by *Trypanosoma cruzi* amastigotes in cardiomyocytes : potential role in parasite cycle completion. *Am J Pathol*. 2005 ; 167(4):993-1003.
- Wang J, Majkova Z, Bever CR, Yang J et al. One-step immunoassays for tetrabromobisphenol a using a camelid single domain antibody-alkaline phosphatase fusion protein. *Anal Chem*. 2015 ; 87(9):4741-4748.

Wang P, Li G, Yan J, Hu Y, Zhang C, Liu X, Wan Y. Bactriam camel nanobody-based immunoassay for specific and sensitive detection of Cry1Fa. *Toxicon*. 2014 ; 92:186192.

Wang Y, Fan Z, Shao L, Hou X, Tian D, Xiao Y, Yu L. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. *Int J Nanomedicine*. 2016 ; 11:3287-3303.

Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics*. 2005 ; 171(2):527-543.

WHO. Anti-*Trypanosoma cruzi* Assays: operational characteristics, report 1 ; 2010.

Wu Y, Jiang S, Ying T. Single-domain antibodies as therapeutics against human virus diseases. *Front Immunol*. 2017 ; 8 : 1802.

## Z

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature : second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 ; 104(7) : 1051-1054.

Zhu M, Gong X, Hu Y, Ou W, Wan Y. Streptavidin-biotin-based directional double nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. *J Transl Med*. 2014 ; 12 : 352.

Zulantay I, Venegas J, Apt W, Solari A, Sanchez G. Lytic antibodies in *Trypanosoma cruzi*-infected persons with low parasitemia. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 ; 58(6):775-779.

## **EVOLUTION PROFESSIONNELLE, PUBLICATIONS & FORMATIONS**

1998 - 1999 : Licence en Biologie cellulaire & Physiologie, **UPMC, Paris** et Certificat d'Etudes Spécialisées en Biologie Moléculaire, **Laboratoire de Génétique - Biologie Moléculaire (Directeur Pr. Axel Kahn), INSERM U129 - ICGM (Hôpital Cochin - Paris)**. Etude de la protéine SRF (Serum Response Factor) et de sa construction tronquée chez des souris transgéniques.

2000 : Technicien de laboratoire, **Laboratoire Biologie Médicale (Dr Dr J-D Cavallo) Hôpital d'Instructions des Armées Bégin (94 Saint Mandé)**. Dépistage de différents agents pathogènes, entretien de lignées cellulaires et travaux de recherche sur la sélection in vitro de résistances aux quinolones chez *Salmonella Hadar*, *Enteretidis* et *Typhimurium* par Electrophorèse en champ pulsé et AS-PCR-RFLP.

2001 - 2011 : Technicien Supérieur de Laboratoire, **Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosoma (Dr P. Minoprio) Institut Pasteur (Paris)**. Responsabilité de plusieurs protocoles de recherche, mise en place de techniques poussées, dont la protéomique et participation active à plusieurs projets de recherche et à l'encadrement d'étudiants de Master 2 ou de doctorat du laboratoire et de nouveaux techniciens. Co-auteur de plusieurs publications et plus particulièrement celles mettant en évidence un phénomène de « transplicing » pour la protéine *TcPRAC* et la présence d'acides aminés D libres et liés aux protéines de *Trypanosoma cruzi*.

2010 : DUT de Génie Biologique option Diététique, **UPEC, Créteil**

2012 - 2014 : Diététicien Hospitalier, **Hôpital de l'Archet / Fondation Lenval - C.H.U de Nice**. Service d'hémo-oncologie pédiatrique. Services adultes : infectiologie, hématologie, médecine interne, chirurgie digestive. Organisation et mise en place d'actions sur la complémentation nutritionnelle orale, les alimentations artificielles et les règles d'hygiène à respecter pour les patients traités avec certaines chimiothérapies. Coordinateur d'un projet de soin sur l'application et l'évolution des recommandations des protocoles de l'alimentation protégée en cas d'aplasie profonde ou de greffe de moelle osseuse. Animation d'ateliers en groupe, sur l'alimentation et la santé, auprès d'assurés du régime général de la sécurité sociale visant la prévention primaire de pathologies telles que le diabète et les maladies cardio-vasculaires.

2015 : Master 2 (dérogation obtenue par Validation des Acquis Professionnels), **UPMC, Paris**

2015 - 2018 Préparation d'un Doctorat de **Sorbonne Université** en Immunologie / Microbiologie, Ecole Doctorale ED 515 "Complexité du Vivant", **Laboratoire des Processus Infectieux à Trypanosomatidés à l'Institut Pasteur de Paris**. (Directrice de Thèse **Dr. P. Minoprio**) et à l'**Institut de Médecine Tropicale - Faculté de Médecine de Sao Paulo / Université de Sao Paulo (Brésil)**, en collaboration avec les Professeurs E. Sabino et M. N Sato de Mars à Mai 2018 et de Septembre à Octobre 2018. Projet en partenariat industriel avec les laboratoires bioMérieux. Intitulé de la Thèse : La *Trypanosoma cruzi* proline racemase, un marqueur diagnostique et de suivi pour la Maladie de Chagas ?

## **PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES (DURANT LE DOCTORAT)**

Coatnoan N, Dias de Melo G, Cosson A, Lafaye P, Bossus M, Paranhos Baccala G, Brignoli E, Minoprio P. Specific serological and molecular tools for diagnosis of experimental Chagas infection and disease : towards a reliable test for diagnosis and monitoring of treatment efficacy. *Soumis à publication* à PLoS Neglected Tropical Disease.

Aguiar Amaral P, Autheman D, Dias de Melo G, Gouault N, Cupif JF, Goyard S, Dutra P, Coatnoan N, Cosson A, Monet D, Saul F, Haouz A, Uriac P, Blondel A, Minoprio P. Designed mono- and di-covalent trap modeled functional motions for *Trypanosoma cruzi* proline racemase. PLoS Neg Trop Dis. 2018, 12(10):e0006853. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30372428>

Guedes RLM, Rodrigues CMF, Coatnoan N, Cosson A, Cadioli FA, Garcia HA, Gerber AL, Machado RZ, Minoprio PMC, Teixeira MMG, de Vasconcelos ATR. A comparative in silico linear B-cell epitope prediction and characterization for South American and African *Trypanosoma vivax* strains. Genomics. 2018 ; pii ; S0888-7543(18)30126-5. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29499243>

## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ANTERIEURES

Berneman A, Alves-Ferreira M, Coatnoan N, Chamond N, Minoprio P. Medium/high throughput D-amino acid oxidase colorimetric method for determination of D-amino acids. J Microbial Biochem Technol. 2010 ; 2(6) : 139-146. <https://www.omicsonline.org/high-throughput-d-amino-acid-oxidase-colorimetric-method-for-determination-of-d-amino-acids-application-for-amino-acid-racemases-1948-5948.php?aid=1088>

Coatnoan N, Berneman A, Chamond N, Minoprio P. Proline racemases: insights into *Trypanosoma cruzi* peptides containing D-proline. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 ; 104(1) : 295-300. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753488>

Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Minoprio P. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a *Trypanosoma vivax* proline racemase. Mol Biochem Parasitol. 2009 ; 165(2) : 170-179. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19428664>

Goytia M, Chamond N, Cosson A, Coatnoan N, Hermant D, Berneman A, Minoprio P. Molecular and structural discrimination of Proline Racemase and Hydroxyproline-2-Epimerase from nosocomial and bacterial pathogens. PloS One. 2007 ; 12;2(9):e885. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17849014>

Buschiazzo A, Goytia M, Schaeffer F, Degrave W, Shepard W, Gregoire C, Chamond N, Cosson A, Berneman A, Coatnoan N, Alzari PM, Minoprio P. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. Proc Natl Acad Sci USA. 2006 ; 103(6) : 1705-1710. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446443>

Chamond N, Goytia M, Coatnoan N, Barale JC, Cosson A, Degrave WM, Minoprio P. *Trypanosoma cruzi* proline racemases are involved in parasite differentiation and infectivity. Mol Microbiol. 2005 ; 58(1) : 46-60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16164548>

Chamond N, Gregoire C, Coatnoan N, Rougeot C, Freitas-Junior LH, da Silveira JF, Degrave WM, Minoprio P. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. J Biol Chem. 2003 ; 278(18) : 15484-15494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12735293>

Chamond N, Coatnoan N, Minoprio P. Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2002 ; 2(3) : 247-254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12476489>

## **PRESENTATIONS & COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES**

Présentation orale au XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology à Caxambu (Brésil); novembre 2016

Présentation orale aux Journées du Département Infection & Epidémiologie de l'Institut Pasteur; juin 2017

Présentation orale au XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology à Caxambu (Brésil); novembre 2017

## **FORMATIONS SUIVIES AU COURS DU DOCTORAT**

DU.GBM "Valorisation de la Recherche et de l'Innovation Biomédicale" (UPMC / AP-HP ; janvier - mars 2017)

Modules de Bio-informatique OBI1, OBI3 et OBI4 (UPMC ; décembre 2016 - avril 2017)

Expérimentation animale – Niveau concepteur (Institut Pasteur ; avril 2016)

Habilitation au travail en milieu confiné P3/A3 (Institut Pasteur ; septembre 2015)

## RESUME

La Maladie de Chagas provoquée par le protozoaire eucaryote *Trypanosoma cruzi* sévit principalement en Amérique Latine et Centrale. On assiste aujourd'hui à l'émergence de ce fléau, au delà des zones d'endémie sur d'autres continents due à l'augmentation de la migration des populations. Cette maladie qui peut rester silencieuse pendant plusieurs années est difficilement décelable en dehors de la phase aiguë de l'infection quand le parasite est plutôt sous sa forme intracellulaire. Aujourd'hui, aucun moyen diagnostique direct ou indirect n'est fiable à 100% et ne permet la détection du parasite dans les tissus profonds. Aucun vaccin n'est disponible et les traitements actuels ne sont pas satisfaisants. A ces difficultés se rajoutent la haute variabilité des souches du parasite ainsi que les importantes réactions croisées avec d'autres pathogènes.

Le laboratoire a découvert et caractérisée la première proline racémase eucaryote qui est également un mitogène pour les cellules B, excrétée/sécrétée par les formes infectantes du parasite : la *Trypanosoma cruzi* proline racémase (*TcPRAC*). Cette enzyme est un facteur de virulence pour le parasite et est indispensable à sa survie. Des études phylogénétiques ont démontré que les gènes codant pour la *TcPRAC* sont présents dans tous les génotypes de *T. cruzi* et sont absents chez les autres trypanosomatidés infectieux pour l'Homme ainsi que chez les mammifères. Par conséquent, la *TcPRAC* pourrait être un marqueur spécifique de la Maladie de Chagas.

Grâce à la mise au point de différents tests sérologiques et moléculaires utilisant différents anticorps spécifiques dirigés contre la *TcPRAC*, ainsi que des amorces ciblant les gènes *TcPRAC*, nous avons pu dépasser certaines de ces difficultés. Nous avons mis en évidence, en utilisant le modèle expérimental, que la *TcPRAC* est effectivement un marqueur diagnostique spécifique de l'infection mais surtout un marqueur qui permettrait d'affirmer l'efficacité d'un traitement, administré aussi bien pendant la phase aiguë que pendant la phase chronique de l'infection.

Nous avons été capables de suivre le processus infectieux en temps réel par imagerie *in vivo* du modèle expérimental grâce à la génération de deux souches de parasites exprimant de façon constitutive le gène de la *Firefly luciferase* et un gène codant pour une molécule fluorescente (la *Green Fluorescent Protein* ou l'E2-Crimson). Nous avons produits des anticorps recombinants V<sub>H</sub>H (ou *Nanobodies*) anti-*TcPRAC*, obtenus suite au criblage par *Phage Display* d'une banque immune d'un alpaca immunisé. Ces V<sub>H</sub>H, de part leur petite taille et leur stabilité, peuvent diffuser rapidement dans les tissus. Ces anticorps ont montré leur capacité de pénétrer et de se fixer sur la *TcPRAC* intracellulaire exprimée par des parasites vivants *in vitro*. Avec ces outils, nous avons entrepris la mise au point d'un prototype pour la détection des parasites intracellulaires *in vivo*.

Par ailleurs, à partir de la structure cristallographique de la *TcPRAC* et du développement d'un modèle virtuel générant différents états de transitions potentiels de l'enzyme et du site catalytique en présence ou non de son ligand, nous avons pu cibler et optimiser de nouveaux composés trypanocides en vue d'un développement de nouvelles chimiothérapies contre la Maladie de Chagas.