

Optimisation d'un biomarqueur salivaire d'exposition des bovins aux piqûres de la mouche tsé-tsé basé sur une combinaison de peptides synthétiques

Martin Bienvenu Somda^{1,2*}, Jacques Kaboré^{1,3}, Ernest Wendemanegdé Salou^{1,3}, Dieudonné Ouattara¹, Emilie Dama³, Soumaïla Pagabeleguem^{4,5}, Sèssèya Arnaud Soha⁶, Issa Sidibé^{1,5}, André Zongo⁷, Adrien Marie Gaston Belem², Zakaria Bengaly¹

Résumé

Le développement de biomarqueurs d'exposition basés sur l'évaluation de la réponse anticorps dirigée contre des peptides synthétiques, a été proposé comme méthode alternative / complémentaire aux stratégies d'évaluations entomologiques par piégeages, dans beaucoup de maladies vectorielles. Cette étude avait pour objectif de développer un biomarqueur d'exposition des bovins aux piqûres de glossines basé sur une combinaison de peptides salivaires synthétiques. La réactivité sérologique de quatre peptides individuels (Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsall₅₂₋₇₅, Tsall₁₄₅₋₁₆₆, Tsgfl₁₈₋₄₃) et en combinaison de deux, a été évaluée par ELISA-indirect. La spécificité du biomarqueur a été évaluée à partir d'échantillons provenant de bovins exposés à d'autres vecteurs hématophages. L'aptitude du meilleur biomarqueur candidat à discriminer différents niveaux d'exposition a ensuite été étudiée chez 10 Zébus (race trypanosensible) et 10 Baoulés (race trypanotolérante) exposés pendant 10 semaines en conditions expérimentales. La combinaison Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ a montré la plus forte réactivité sérologique ($p = 0,0003$). Des réactions croisées entre cette combinaison bipeptidique et les tabanidés ont été mises en évidence. De plus, le suivi du biomarqueur chez les bovins exposés, a montré qu'il semble être spécifique à une sous-classe d'IgG apparaissant tôt et dont la clairance a été observée avant la fin de l'exposition. Ces résultats ont montré que le biomarqueur bipeptidique présente une bonne sensibilité sérologique. Il n'est cependant pas spécifique du genre *Glossina* et est peu pertinent dans la discrimination de l'hétérogénéité d'exposition inter-individuelle. Des études ultérieures seraient nécessaires pour améliorer le pouvoir discriminatoire du biomarqueur salivaire afin de le mettre à la disposition des programmes de lutte anti-vectorielle.

Mots-clés : Trypanosomose Animale Africaine, mouche tsé-tsé, biomarqueur d'exposition, combinaison de peptides, lutte anti-vectorielle.

Abstract

The development of biomarkers of exposure based on the evaluation of the antibody response against synthetic peptides has been proposed as an alternative/complementary method to entomological assessment strategies by trapping in many vector-borne diseases. The objective of this study was to develop a biomarker of exposure of cattle to tsetse bites based on a combination of salivary synthetic peptides. The serological reactivity of four individual peptides (Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsall₅₂₋₇₅, Tsall₁₄₅₋₁₆₆, Tsgfl₁₈₋₄₃) and their combination in two, has been evaluated by indirect-ELISA. The biomarker specificity was evaluated using samples from cattle exposed to different haematophagous vectors. The ability of the best candidate biomarker to discriminate different levels of exposure was then studied in 10 Zebus (trypanosusceptible race) and 10 Baoulés (trypanotolerant race) exposed for 10 weeks in experimental settings. The combination Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ showed the highest serological reactivity ($p = 0.0003$). Cross-reactions between this bipeptide combination and horse flies were demonstrated. In addition, monitoring of the biomarker in exposed cattle showed that it appears to be specific to an early-emerging IgG subclass with clearance before the end of exposure. These results showed that the bipeptide biomarker has good serological sensitivity. But it does not happen to be specific to *Glossina* genus and fails to accurately measure host-vector contact. Further investigations are needed to improve the antigenicity of this biomarker in order to make it available to vector control programmes.

Keywords: African Animal Trypanosomosis, tsetse flies, biomarker of exposure, combination of peptides, vector control.

¹Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Unité de recherche sur les maladies à vecteurs et biodiversité (UMaVeB), 01 BP 454 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

²Université Nazi BONI (UNB), Institut du Développement Rural (IDR), 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

³Université Nazi BONI (UNB), Unité de Formation et de Recherche en Sciences et Techniques (UFR/ST), 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

⁴Université de Dédougou (UDDG), BP 176, Dédougou, Burkina Faso

⁵Insectarium de Bobo-Dioulasso-Campagne d'Éradication de la mouche Tsé-tsé et

de la Trypanosomose (IBD-CETT), 01 BP 1087 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

⁶Unité de Recherche en Microbiologie Appliquée et Pharmacologie des Substances Naturelles, Laboratoire de Recherche en Biologie Appliquée, Université d'Abomey-Calavi, 01 BP 2009 Cotonou, Bénin

⁷Centre Universitaire Polytechnique de Gaoua (CUP/G), Université Nazi Boni BONI (UNB), 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

* Auteur correspondant : Martin Bienvenu Somda, e-mail : somdabienvenu@yahoo.fr, adresse postale : UNB, IDR, 01 BP 1091 Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

1. Introduction

Les glossines ou mouches tsé-tsé sont les vecteurs cycliques des trypanosomes, pathogènes responsables de la maladie du sommeil ou Trypanosomose Humaine Africaine (THA) chez l'homme et de la *Nagana* ou Trypanosomose Animale Africaine (TAA) chez le bétail. On estime que 60 millions de personnes

et plus de 50 millions de bovins répartis dans 38 pays d'Afrique subsaharienne sont exposés au risque de ces trypanosomoses africaines dont les conséquences socio-économiques sont importantes (Vreysen *et al.*, 2013). Les possibilités de mise au point d'un vaccin ayant échoué en partie à cause de la grande variabilité antigénique du trypanosome (Duvallat *et al.*, 2003), et les principales stratégies de lutte développées avec pour

objectif final l'éradication des THA et TAA demeurent (i) la chimioprophylaxie et la chimiothérapie utilisant des molécules trypanocides, (ii) la promotion du bétail trypanotolérant dans les zones endémiques et (iii) la lutte anti-vectorielle (LAV) utilisant diverses techniques (Vreysen *et al.*, 2013). Bien que des ressources importantes soient investies chaque année, ces méthodes de lutte montrent aujourd'hui des limites telles que la ré-invasion des zones assainies, la toxicité ou l'inefficacité des trypanocides, la chimiorésistance des trypanosomes, la perte de pureté des races trypanotolérantes due aux mélanges anarchiques, etc.

Parmi toutes ces méthodes de lutte, la LAV semble être la stratégie de lutte la plus appliquée contre les TAA et THA (Rayaisse *et al.*, 2020). Elle est cependant tributaire d'une bonne évaluation entomologique utilisant des pièges à mouches tsé-tsé afin de mieux cibler les zones à risque de transmission et d'évaluer l'efficacité de cette LAV. Ces méthodes d'évaluation entomologiques classiques se heurtent aujourd'hui à des contraintes liées à l'attractivité variable des pièges surtout dans les zones à faibles densités glossiniennes (Bouyer *et al.*, 2010), l'inaccessibilité de certaines zones (mangroves, localités difficiles d'accès en saison pluvieuse) (Kagbadouno *et al.*, 2011) et la couverture de vastes zones géographiques. De plus, les pièges à tsé-tsé qui sont des appâts fixes sont également moins adaptés pour l'évaluation entomologique, car ils ne tiennent pas compte de l'hétérogénéité de l'exposition des hôtes aux arthropodes hématophages qui peut résulter de certains facteurs tels que l'âge, l'activité quotidienne des populations humaines étudiées, le parcours des troupeaux, etc. L'estimation biaisée des densités de glossines par ces méthodes entomologiques ne représente donc qu'une évaluation indirecte du contact hôte / glossine. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouveaux outils complémentaires ou alternatifs à ces méthodes classiques d'évaluation entomologiques dont l'efficacité s'amenuise avec les difficultés rencontrées sur le terrain.

La salive n'est pas neutre dans la relation hôte vertébré-arthropode hématophage. En effet, l'efficacité du repas de sang chez les vecteurs hématophages est assurée par les protéines salivaires (Ribeiro *et al.*, 1995). Au cours des deux dernières décennies, est né le concept de biomarqueurs salivaires d'exposition aux piqûres des arthropodes vecteurs hématophages basé sur la détection chez l'homme et chez l'animal (souris, lapins, chiens, porcs, bovins, etc) des anticorps dirigés contre les antigènes salivaires totaux de ces vecteurs (Fontaine *et al.*, 2011).

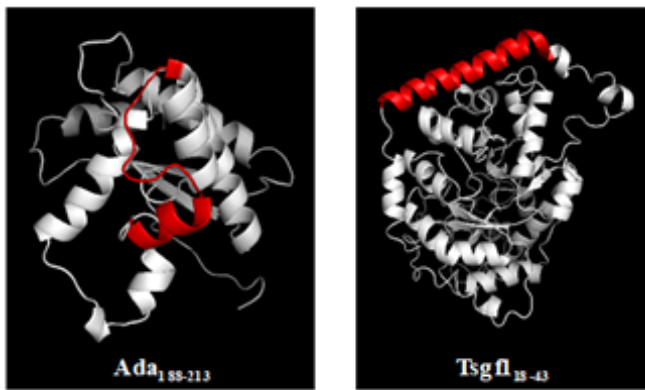
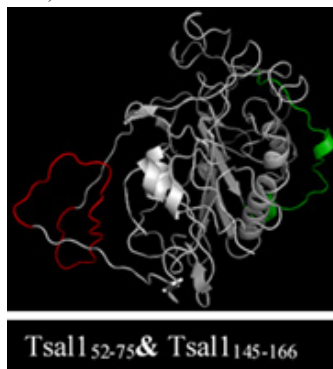
Ces biomarqueurs ont été validés pour certaines maladies liées aux vecteurs comme les tiques (Lane *et al.*, 1999), les moustiques (Remoue *et al.*, 2006; Ndille *et al.*, 2012), les triatomés (Schwarz *et al.*, 2009) ou encore les phlébotomes (Barral *et al.*, 2000; Vlkova *et al.*, 2012). Nous avons montré que la réponse anticorps dirigée contre les antigènes salivaires totaux de glossines constitue un indicateur potentiel de l'exposition de l'homme (Dama *et al.*, 2013b) et des bovins (Somda *et al.*, 2013) aux piqûres de tsé-tsé. Cependant l'utilisation des antigènes salivaires totaux fait face à des problèmes de spécificité, de conservation (dégradation même à -80°C), de production

de masse et de reproductibilité des tests immunologiques (Drame *et al.*, 2010; Fontaine *et al.*, 2011). Dans le souci d'optimisation de ces biomarqueurs, nos recherches ont été orientées vers l'utilisation des peptides synthétiques et spécifiques. C'est ainsi que nous avons récemment identifié par une approche *in silico* quatre peptides sur les séquences de trois protéines salivaires reconnues par des plasmas humains provenant de zones infestées de glossines (Dama *et al.*, 2013b) et de bovins expérimentalement exposés aux tsé-tsé (Somda *et al.*, 2016). Le mono-peptide Tsgf1₁₈₋₄₃ identifié pour le volet humain, a été utilisé pour valider l'efficacité d'une campagne de LAV dans un foyer actif de la maladie du sommeil dans le foyer de Boffa en Guinée (Courtin *et al.*, 2015). Ces peptides, susceptibles de porter un ou deux épitopes connaissent cependant des problèmes de sensibilité lors des tests sérologiques chez le bovin, d'où l'idée de les combiner à deux. Cette stratégie de combinaison d'épitopes a été réalisée avec succès sur le gain de la sensibilité et de la spécificité, en utilisant des protéines recombinantes de la salive de phlébotomes en zone endémique de leishmaniose (Souza *et al.*, 2010; Vlkova *et al.*, 2012). L'objectif général de cette étude était de développer un biomarqueur d'exposition des bovins aux piqûres de glossines basé sur une combinaison de peptides salivaires synthétiques. Il s'est agi spécifiquement (i) d'évaluer le potentiel biomarqueur de la meilleure combinaison de deux peptides salivaires synthétiques et (ii) d'étudier l'aptitude de la meilleure combinaison à discriminer l'hétérogénéité d'exposition inter-individuelle.

2. Matériel et méthodes

2.1. Peptides synthétiques salivaires

Les candidats biomarqueurs sont des peptides prédits par une analyse *in silico* à partir des protéines salivaires immunogéniques spécifiques de l'exposition des bovins ou des humains aux mouches tsé-tsé. Les antigènes salivaires de *Glossina (G.) morsitans (m.) morsitans* ont été utilisés pour ces analyses de prédiction et de bioinformatique car c'est la seule espèce pour laquelle il existe des données dans les banques protéiques (Alves-Silva *et al.*, 2010). Nous avons au total quatre peptides candidats dont deux sont reconnus par l'Homme et représentés en rouge sur les protéines salivaires Ada (adenosine deaminase) et Tsgf1 (*tsetse saliva growth factor-1*) (**Figure 1A**) (Dama *et al.*, 2013a) et deux reconnus par les bovins et représentés en rouge et en vert sur la protéine salivaire Tsall1 (*tsetse salivary gland protein 1*) (**Figure 1B**) (Somda *et al.*, 2016). Ces peptides salivaires ont été synthétisés par voie chimique avec une pureté de 95% par Genepep SA (St-Jean de Vedas, Montpellier, France). Pour améliorer l'antigénicité des peptides, une queue adénylée a été ajoutée aux extrémités C-terminales des peptides (---AAAA) et un groupement acétyle aux extrémités N-terminales. Ils ont été expédiés sous forme lyophilisée et ont ensuite été ré-suspendus dans de l'eau ultra-pure (1 mg/mL), aliquotés et stockés à -80° C jusqu'à leur utilisation.

(A) Peptides candidats en rouge reconnus par l'Homme (Dama *et al.*, 2013a)(B) Peptides candidats en rouge et vert reconnus par le bovin (Somda *et al.*, 2016)**Figure 1** : Modèle 3D des protéines immunogéniques et les positions des peptides candidats.

2.2. Echantillonnage de sérums

Les échantillons de sérums ayant servi à la réalisation de cette étude provenaient de bovins (i) antérieurement exposés en conditions contrôlées à différentes intensités de piqûres de *G. m. submorsitans* et d'autres arthropodes hématophages (*Amblyomma variegatum*, *Anopheles gambiae*, *Tabanidae spp*, *Stomoxys spp*) et (ii) vivant dans une zone non infestée de glossines au Nord du Burkina Faso comme échantillons négatifs. Ces différents échantillons étaient disponibles dans la sérothèque bovine du CIRDES.

Les échantillons (n = 20) issus de bovins fortement exposés en conditions contrôlées aux piqûres de glossines (exposés à 50 glossines, 2 fois par semaines) ont été utilisés dans l'évaluation de la réactivité sérologique des peptides candidats. Ces bovins avaient de fortes réponses anticorps dirigées contre les antigènes salivaires totaux de glossines (Somda *et al.*, 2013). Le seuil de positivité a été déterminé à partir des 15 échantillons négatifs provenant du Nord du Burkina Faso.

La spécificité analytique du test a été étudiée à partir d'échantillons provenant de bovins exposés à différents arthropodes hématophages, dont 10 sérums choisis par type d'arthropode. Ce paramètre évalue l'aptitude du biomarqueur à identifier de manière spécifique les individus exposés aux piqûres de glossines.

L'étude de l'hétérogénéité d'exposition inter-individuelle a été réalisée avec des sérums de 20 vaches de deux races (10 Zébus, trypanosensibles et 10 Baoulés trypanotolérants) : 4 vaches fortement exposées (50 glossines, 2 fois par semaine), 4 vaches

faiblement exposées (10 glossines, une fois par semaine) et 2 vaches témoins non exposées (Somda *et al.*, 2013). L'exposition avait une durée de 10 semaines et 10 échantillons de sérums prélevés ont été analysés par animal.

Les échantillons ainsi sélectionnés (n = 285) ont été analysés par la méthode ELISA-indirect (*Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay*) contre les peptides en individuel et en combinaison de deux.

2.3. Evaluation de la réponse anti-peptide par ELISA-indirect

Les réponses anticorps dirigés contre les peptides ont été mesurées par la technique ELISA-indirect selon le protocole développé antérieurement par Somda *et al.* (2016) avec de légères modifications. Son principe repose sur la fixation d'antigènes solubles ou sensibilisation de microplaques en polystyrène Maxisorp à fonds plats (Nunc, VWR, France) avec 100 µl de peptides synthétiques dilués à 20 µg/ml dans du tampon carbonate-bicarbonate (0,05 M, pH 9,6). Les plaques ont été incubées pendant 1h à 37°C, suivi d'une incubation à 4°C toute la nuit. Après une série de trois lavages en eau-Tween20 0,1%, suivie de la saturation des sites non spécifiques à 37°C par du tampon de saturation (lait écrémé 5%-PBS-Tween20 1%) ; les sérums dilués individuellement au 1/60 dans le tampon de saturation, ont été incubés pendant 1h30 à 37°C. Après 4 séries de lavage à l'eau-Tween20 0,1%, les anticorps secondaires anti-bovins IgG totaux couplés à la peroxydase de Raifort (AbD Serotec, France), dilués à 1/4000 dans du tampon de saturation, ont été déposés dans tous les puits à raison de 100 µl/puits. Les plaques ont été ensuite incubées à 37°C pendant 1h30. Après incubation de l'anticorps secondaire, les plaques ont été lavées 4 fois avec de l'eau-Tween20 0,1% et rincées une fois avec de l'eau distillée afin d'éliminer toute trace de détergent qui pourrait perturber l'activité enzymatique. La révélation a été faite à l'aide de l'eau oxygénée (H₂O₂) et de l'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium). La lecture des plaques a été faite à 405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre.

Les résultats bruts ont été obtenus sous forme de densités optiques (DO). Chaque échantillon de sérum a été testé en double dans des puits avec antigènes ou puits Ag+ (DO_m, moyenne des DO de ces puits, DO_m=(DO1+DO2)/2) et une fois dans un puits sans antigène ou puits Ag- (pour évaluer les réactions non spécifiques entre les anticorps et les réactifs ELISA, DO_n). Les résultats finaux ont été exprimés en ΔDO selon la formule suivante : ΔDO = DO_m - DO_n. Par contre les résultats du suivi de la réponse anti-peptide ont été calculés en ΔDOTi-ΔDOT0, où ΔDOTi est la réponse anticorps à une date donnée et ΔDOT0 la réponse avant l'exposition.

2.4. Traitement et analyse statistiques des données

La constitution des différentes bases de données et le tracé des courbes moyennes de suivi de la réponse anticorps anti-peptide ont été réalisés avec le logiciel Excel 2016. La normalité des réponses anticorps a été vérifiée en utilisant le test de Shapiro-Wilk. Si les données ne suivaient pas la loi normale, les tests non paramétriques de Man-Whitney ou celui de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer respectivement deux ou plusieurs moyennes des réponses anticorps. Ces différents tests et les nuages de points ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism

5.0. Ce logiciel a aussi permis de créer un modèle linéaire pour une analyse stratifiée de la réponse anti-peptide à chaque date des groupes exposés (fort ou faible) de chaque race (Zébu, Baoulé) en fonction du groupe témoin non exposé. Le groupe fortement exposé a également été comparé au groupe faiblement exposé pour chacune des races. Le seuil de significativité était fixé à 5%.

Le seuil de positivité “S” a été déterminé à partir des échantillons négatifs. Il correspond à la borne supérieure de l’intervalle de confiance calculé à partir d’une distribution “t” autour de la moyenne des DO des échantillons négatifs contre la meilleure combinaison de peptides retenus ($\alpha = 0,01$) (Sokal et Rohlf, 1981). La formule suivante a été utilisée :

$$S = m + t \times s \sqrt{\frac{n+1}{n}}$$

S : seuil de positivité ;

m : moyenne des échantillons négatifs ;

t : valeur donnée dans la table t de Student ($\alpha = 0,01$) ;

s : écart-type de la distribution des Δ DO des échantillons négatifs ;

n : nombre d’échantillons négatifs.

3. Résultats

3.1. Antigénicité des différents peptides candidats biomarqueurs salivaires

La **figure 2** montre le profil des réponses anticorps IgG totaux contre les quatre peptides candidats biomarqueurs. Chacune des barres rouges représente les différents niveaux médians d’IgG spécifiques. Les réponses IgG médianes sont significativement différentes entre les quatre peptides ($p < 0,0001$). Par ordre décroissant d’antigénicité, on a Tsall₁₄₅₋₁₆₆, Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsall₅₂₋₇₅ et Tsgfl₁₈₋₄₃. Ces résultats montrent que le peptide Tsgfl₁₈₋₄₃ présente une faible antigénicité, d’où la décision de l’écartier pour la suite de l’étude.

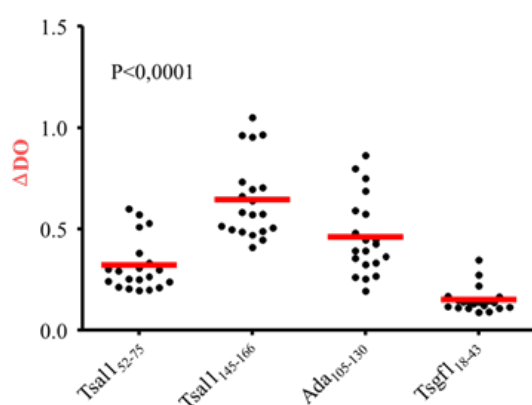


Figure 2 : Niveaux d’IgG anti-peptide détectés par les différents peptides.

3.2. Antigénicité des différentes combinaisons de peptides biomarqueurs

Les meilleurs peptides retenus en termes de sensibilité à l’issue du screening des différents candidats biomarqueurs, Tsall₁₄₅₋₁₆₆, Ada₁₀₅₋₁₃₀ et Tsall₅₂₋₇₅, ont été associés deux à deux. On a ainsi obtenu trois combinaisons de peptides synthétiques. La

réponse IgG spécifique des 20 sérums précédemment utilisés a été évaluée contre chacune de ces trois combinaisons.

Les niveaux médians d’IgG spécifiques individuellement détectés par chacun des peptides Tsall₁₄₅₋₁₆₆ et Tsall₅₂₋₇₅ ont été comparés à celui détecté par la combinaison des deux (**Figure 3**). En effet, la combinaison a détecté un niveau médian d’IgG spécifique significativement plus élevé que celui détecté par le peptide Tsall₅₂₋₇₅ ($p = 0,0002$). Par contre le peptide Tsall₁₄₅₋₁₆₆ a détecté un niveau médian significativement plus élevé que celui détecté par la combinaison ($p = 0,0086$). Ces résultats montrent que la combinaison présente une réactivité immunologique plus faible que celle dont est dotée le peptide Tsall₁₄₅₋₁₆₆. Ce constat a donc motivé l’abandon de cette combinaison.

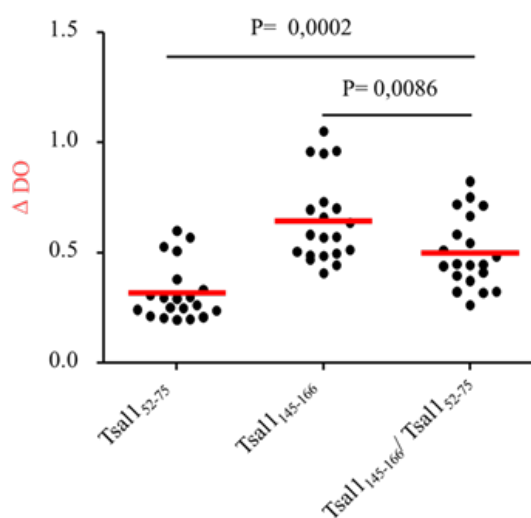


Figure 3 : Comparaison des titres d’IgG anti-peptide détectés par chacun des peptides Tsall₁₄₅₋₁₆₆, Tsall₅₂₋₇₅ et de leur combinaison.

De plus, la comparaison entre le niveau médian d’IgG spécifiques reconnus par Ada₁₀₅₋₁₃₀ et celui détecté par la combinaison Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₅₂₋₇₅ (**Figure 4**) n’a montré aucune différence significative ($p = 0,1584$). Néanmoins, une différence significative était bien établie entre la réponse détectée contre le peptide Tsall₅₂₋₇₅ et celle détectée contre la combinaison ($p = 0,0104$). Ces résultats montrent que la combinaison Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₅₂₋₇₅ n’améliore pas la réactivité sérologique. Ainsi, cette combinaison a été également abandonnée.

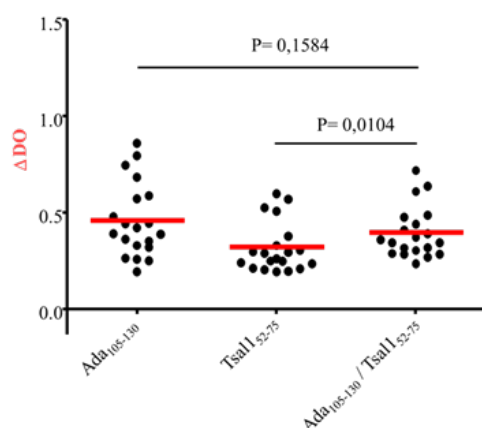


Figure 4 : Comparaison des titres d’IgG anti-peptide détectés par chacun des peptides Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsall₅₂₋₇₅ et de leur combinaison.

Une différence significative a été notée en comparant les niveaux d'IgG spécifiques individuellement détectés par Tsall₁₄₅₋₁₆₆ et Ada₁₀₅₋₁₃₀ à celui affiché par la combinaison de ces épitopes, respectivement (**Figure 5**; $p < 0,0001$). Ce qui signifie que l'association de ces deux candidats biomarqueurs permet d'obtenir un gain de sensibilité immunologique. Par ailleurs, une comparaison des réponses IgG spécifiques contre les trois combinaisons de peptides rapporte une différence significative ($p = 0,0003$) entre ces derniers. Ce niveau médian d'IgG était de 0,59 pour la combinaison Tsall₁₄₅₋₁₆₆/Ada₁₀₅₋₁₃₀, de 0,45 pour Tsall₅₂₋₇₅/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ et enfin de 0,35 pour Tsall₅₂₋₇₅/Ada₁₀₅₋₁₃₀. L'ensemble des résultats suggèrent que la combinaison formée par Tsall₁₄₅₋₁₆₆ et Ada₁₀₅₋₁₃₀ présente la meilleure réactivité immunologique. Cette combinaison a donc été retenue pour la suite de l'étude.

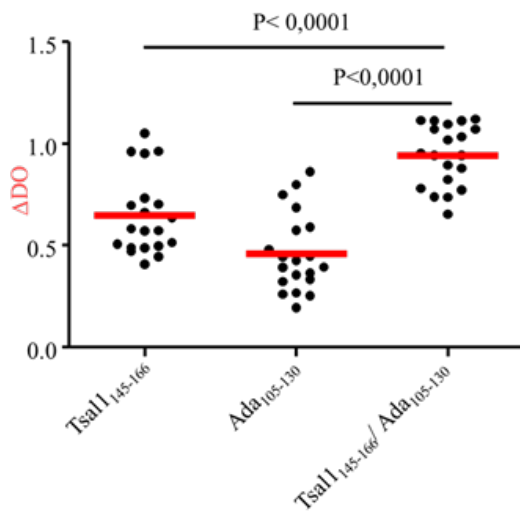
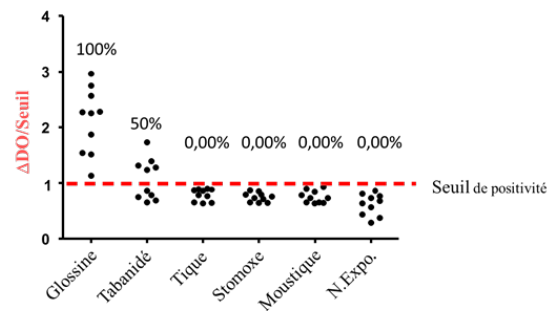


Figure 5 : Comparaison des titres d'IgG anti-peptide détectés par chacun des peptides Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsall₁₄₅₋₁₆₆ et de leur combinaison.

3.3. Spécificité analytique de la meilleure combinaison candidate biomarqueur

L'intensité de la réponse IgG anti-peptide par type d'exposition hétérologue montre un seuil de positivité en tirets représenté par la droite $y = 1$ (**Figure 6**). Tout ratio au-delà de cette droite, est représentatif d'un échantillon positif et celui inférieur à 1, est négatif. Ainsi, tous les échantillons provenant d'animaux fortement exposés aux piqûres de glossines ont présenté des ratios élevés. La moitié des échantillons prélevés chez les animaux exposés aux piqûres de tabanidés ont également présenté des ratios élevés ; suggérant ainsi des réactions croisées entre les antigènes salivaires de ces deux vecteurs hématophages. Par contre les ratios des échantillons provenant des bovins exposés aux piqûres des autres vecteurs et les animaux témoins non exposés sont inférieurs au seuil de positivité. Ceci montre que ces échantillons ne contiennent pas d'anticorps reconnaissables par la meilleure combinaison biomarqueur, par conséquent l'outil séro-épidémiologique d'exposition aux piqûres de glossines est spécifique vis-à-vis de ces vecteurs.

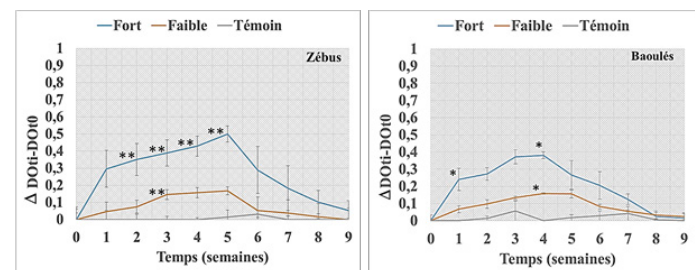


Légende : N. Expo : bovins non exposés aux piqûres de tsé-tsé

Figure 6 : Réponses anticorps anti-Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ induites par les expositions hétérologues.

3.4. Réponse IgG anti-peptide et hétérogénéité d'exposition inter-individuelle

Les moyennes de suivi de la réponse IgG contre la meilleure combinaison de peptides Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ en fonction des niveaux d'exposition (groupes non exposé, faiblement exposé et fortement exposé) et de la race (Zébu, Baoulé) montrent une variabilité de la réponse entre les individus du même groupe d'exposition (**Figure 7**). Ce constat est valable chez les deux races de bovins utilisées dans l'étude. Cette variabilité intra-groupe est remarquable à travers les barres verticales représentant les erreurs standards de la réponse anti-peptide moyenne entre les individus d'un même groupe. De manière générale, la cinétique de la réponse anti-peptide est commune dans les groupes exposés aux piqûres de glossines et quelle que soit la race. Cependant, les plateaux de réponses permettent une distinction de ces groupes d'exposition avant la 4^{ème} semaine pour les Baoulés et la 5^{ème} semaine pour les Zébus.



Légende : (*) quand $p < 0,05$ et (**) quand $p < 0,01$.

Figure 7 : Suivi de la réponse anti-Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₁₄₅₋₁₆₆ induite par différents niveaux d'exposition des bovins Zébus (A) et Baoulés (B) aux piqûres de glossines.

Par ailleurs, une analyse stratifiée par date de la réponse anticorps anti-peptide a permis de faire une comparaison des groupes exposés (faiblement ou fortement) aux groupes témoins. En fonction du niveau d'exposition, des différences ont été mises en évidence. En effet, chez les Zébus, la réponse anti-peptide était significativement plus élevée de la 2^{ème} semaine jusqu'à la 5^{ème} dans le groupe fortement exposé. Par contre dans le groupe faiblement exposé, la réponse anti-salive était significative uniquement à la 3^{ème} semaine. De même, en comparant le groupe fortement exposé au groupe faiblement exposé, des différences statistiquement significatives se dégagent de la 1^{ère} semaine à la 5^{ème} semaine (**Figure 7A**). En ce qui concerne les Baoulés, seules les 1^{ère} et 4^{ème} semaines ont connu une réponse

humorale IgG anti-peptide capable de discriminer de manière significative le groupe fortement exposé du groupe contrôle. Quant au groupe faiblement exposé, il se distingue du groupe contrôle uniquement à la 4^{ème} semaine de l'exposition. En outre, dans le groupe fortement exposé, la réponse IgG anti-peptide était significativement plus élevée à la 2^{ème} semaine, à la 3^{ème} semaine et à la 4^{ème} semaine en comparaison au groupe faiblement exposé (**Figure 7B**).

A partir de la 5^{ème} semaine chez les Zébus et de la 4^{ème} chez les Baoulés, une surprenante baisse de la réponse IgG dirigée contre la meilleure combinaison peptidique a été enregistrée, malgré la poursuite de l'exposition (**Figure 7**).

4. Discussion

Le premier screening de la réponse anticorps dirigée contre les quatre candidats en individuel, Ada₁₀₅₋₁₃₀, Tsgfl₁₈₋₄₃, Tsall₅₂₋₇₅ et Tsall₁₄₅₋₁₆₆, a révélé une différence significative ($p < 0,0001$). Seul le peptide Tsgfl₁₈₋₄₃ a enregistré la faible réactivité immunologique, si bien qu'il était préférable de continuer avec les trois autres peptides. De façon étonnante, le peptide Ada₁₀₅₋₁₃₀ identifié sur une protéine immunogénique chez l'homme (Dama *et al.*, 2013a), a fait preuve d'une réactivité immunologique assez intéressante chez le bovin. Ce résultat, bien qu'inattendu affiche de meilleures perspectives notamment de mise au point d'un outil unique d'évaluation de l'exposition des bovins et des humains aux piqûres de tsé-tsé.

Par ailleurs, l'idée de combiner les épitopes dans la deuxième étape de notre étude, dans le but d'améliorer la réactivité immunologique de l'outil séro-épidémiologique d'évaluation du contact hôte-vecteur, a déjà été efficacement mise en application dans la lutte contre la leishmaniose. En effet, dans une zone endémique de leishmaniose viscérale humaine au Brésil, une combinaison de protéines salivaires recombinantes LJM17 (AF132518) et LJM11 (AY445935) de *Lutzomyia longipalpis* utilisée comme antigènes, a permis non seulement une amélioration de la sensibilité du biomarqueur mais aussi et surtout une augmentation de sa spécificité par rapport aux antigènes salivaires natifs de phlébotomes (Souza *et al.*, 2010). De plus, des souris BALB/c et C57BL/6 pré-exposées aux piqûres de phlébotomes, ont présenté des réactivités différentes vis-à-vis de quatre protéines salivaires recombinantes de ce vecteur. Mais une combinaison de ces antigènes recombinants a pu pallier cette variabilité inter-individuelle chez ces hôtes (Vlkova *et al.*, 2012). En nous basant sur ces acquis, nous avons évalué la réactivité immunologique des trois combinaisons contre les sérums provenant de bovins forts répondeurs, antérieurement utilisés dans la première étape. Les résultats obtenus montrent que les combinaisons Tsall₁₄₅₋₁₆₆/Tsall₅₂₋₇₅ et Ada₁₀₅₋₁₃₀/Tsall₅₂₋₇₅ ont des réponses plus faibles que celles des peptides en individuel. Ceci pourrait s'expliquer par une éventuelle perturbation des épitopes suite à de probables interactions stériques entre des résidus d'acides aminés des différents peptides engagés dans la combinaison. En associant les deux candidats biomarqueurs Ada₁₀₅₋₁₃₀ et Tsall₁₄₅₋₁₆₆, on a obtenu un gain de sensibilité immunologique significativement plus forte que celles des deux peptides présentant des épitopes individuels. Pour cette combinaison, l'interaction entre les deux peptides semblent apporter un regain de sensibilité au candidat

biomarqueur bipeptide.

Les réponses contre la meilleure combinaison de peptides des sérums provenant de bovins exposés aux piqûres des glossines étaient supérieures au seuil de positivité. Les sérums bovins exposés aux piqûres de tabanidés ont réagi à 50%. Ceci montre que cette exposition hétérologue a été à l'origine de réactions croisées avec la combinaison de peptides candidats biomarqueurs. Ces résultats corroborent ceux de Somda *et al.* (2013) qui avaient mis en évidence ces réactions croisées entre le sialome de deux espèces de glossines riveraines (*G. p. gambiensis* et *G. tachinoides*) et celui des tabanidés. Des réactions croisées ont été également documentées entre les sialomes de beaucoup d'arthropodes hématophages (Fontaine *et al.*, 2011), d'où l'idée de développer un biomarqueur d'exposition spécifique. Quant aux animaux exposés aux autres vecteurs, aucune réponse supérieure au seuil de positivité n'a été relevée ; ce qui suggère une absence de réactivités croisées entre les antigènes salivaires de glossine et ceux de ces différents vecteurs. Ces résultats obtenus montrent dans l'ensemble que le biomarqueur basé sur la combinaison Tsall₁₄₅₋₁₆₆ / Ada₁₀₅₋₁₃₀ a une bonne sensibilité, mais semble ne pas être très spécifique du genre *Glossina*. Cette réaction croisée avec la salive des tabanidés ne devrait pas être un frein, vu que ces derniers constituent des vecteurs mécaniques des TAA (Desquesnes et Dia, 2004) et devraient être pris en compte par les programmes de LAV.

L'analyse des réactivités sérologiques chez des bovins (Zébus et Baoulés) exposés à différentes intensités de piqûres de glossines a montré une bonne cinétique d'apparition de la réponse liée aux expositions répétées aux tsé-tsé. Cette réponse augmente graduellement jusqu'à la 4^{ème} ou 5^{ème} semaine avant de décroître de façon étonnante, malgré la poursuite de l'exposition chez les bovins exposés, indépendamment de la race. Cette cinétique d'apparition différente de celle obtenue avec les antigènes salivaires totaux (Somda *et al.*, 2013), serait celle d'une sous-classe IgG très labile spécifiquement reconnue par le candidat bipeptidique antigénique. A partir d'une certaine intensité de piqûres, le biomarqueur perd l'aptitude à discriminer l'hétérogénéité d'exposition inter-individuelle. Pourtant, de la 1^{ère} à la 4^{ème} semaine, le biomarqueur permettait de discriminer les bovins en fonction de leurs niveaux d'exposition aux piqûres de tsé-tsé. Par ailleurs, notre étude a révélé une variabilité entre les animaux du même groupe d'exposition. Ces résultats, similaires à ceux obtenus avec les antigènes salivaires totaux ou le mono-peptide Tsall₅₂₋₇₅ suggèrent qu'au niveau individuel, l'évaluation de la réponse contre la combinaison de peptides peut donc être influencée par le fond génétique du bovin ou d'autres facteurs qui pourraient affecter la réactivité des lymphocytes B vis-à-vis des antigènes salivaires (Somda *et al.*, 2013; Somda *et al.*, 2016). Cela signifie que le biomarqueur basé sur le candidat bipeptidique à développer pourrait seulement être un outil d'évaluation du niveau populationnel d'exposition aux tsé-tsé. Par ailleurs, des réactivités sérologiques plus élevées vis-à-vis de la meilleure combinaison ont été observées chez les Zébus comparés aux Baoulés. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ces Baoulés provenant des zones infestées de glossines (Gaoua, Sud-Ouest du Burkina Faso) (Souvenir Zafindrajaona *et al.*, 1999) ont été inclus dans l'étude avec des fonds de réponse anticorps déjà

forts par rapport aux Zébus provenant d'une zone indemne de glossines (Nord du Burkina Faso) (Courtin *et al.*, 2010) qui ont été sensibilisés peut-être pour la première fois par les piqûres de tsé-tsé lors de notre étude.

5. Conclusion

Les résultats montrent que la combinaison des mono-peptides Ts11₁₄₅₋₁₆₆ et Ada₁₀₅₋₁₃₀ est assez sensible. La réponse contre celle-ci a permis de discriminer pendant les 5 premières semaines de l'exposition les bovins en fonction des niveaux d'exposition (groupe témoin non exposé, faiblement ou fortement exposés) et quel que soit la race bovine (Zébu, Baoulé). Cependant elle semble être spécifique à une sous classe d'IgG apparaissant tôt et dont la clairance s'observe avant la fin de l'exposition. De plus, ce biomarqueur bipeptidique est l'objet de réactivités croisées avec des antigènes salivaires de tabanidés. D'autres perspectives d'amélioration du biomarqueur bipeptidique sont à explorer, notamment l'ajout d'une queue composée d'un dérivé lysine-biotine-amide aux extrémités C-terminales des peptides (---lysine-biotine-CONH₂), afin que les épitopes salivaires soient plus accessibles aux anticorps. Ce rajout de cette queue a été antérieurement utilisé dans un protocole ELISA pour une meilleure détection de la réponse contre des mimotopes des glycoprotéines variables de surface des trypanosomes (Van Nieuwenhove *et al.*, 2012). La recherche d'autres peptides salivaires utilisant d'autres algorithmes (Sima *et al.*, 2019) sont également à explorer.

Remerciements

La présente étude a bénéficié du soutien financier de l'Agence Internationale de l'Energie Atomique (AIEA, Autriche) et de la Fondation Internationale pour la Science (FIS, Suède). Nous remercions également le Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES, Burkina Faso) pour avoir accueilli les travaux de laboratoire.

Références bibliographiques

Alves-Silva J., Ribeiro J.M., Van Den Abbeele J., Attardo G., Hao Z., Haines L.R., Soares M.B., Berriman M., Aksoy S., and Lehane M.J. (2010). An insight into the sialome of *Glossina morsitans morsitans*, BMC Genomics, 213, 1-28.

Barral A., Honda E., Caldas A., Costa J., Vinhas V., Rowton E.D., Valenzuela J.G., Charlab R., Barral-Netto M. and Ribeiro J.M. (2000). Human immune response to sand fly salivary gland antigens : a useful epidemiological marker ? American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 62 (6), 740-745. doi: 10.4269/ajtmh.2000.62.740.

Bouyer J., Solano P., Cuisance D., Itard J., Frézil J.L. and Authié E. (2010). Control methods in Trypanosomosis, Infectious and parasitic diseases of livestock (Eds P, C, Lefèvre, J, Blancou, J, Chermette, G, Uilenberg), Editions Médicales Internationales, Lavoisier, Paris (France).

Courtin F., Rayaissé J.B., Tamboura I., Serdébéogo O., Koudougou Z., Solano P. and Sidibé I. (2010). Updating the Northern Tsetse Limit in Burkina Faso (1949 – 2009): Impact of Global Change. International Journal of Environmental Research and Public Health, 7 (4), 1708-1719. doi: 10.3390/ijerph7041708.

Courtin F., Camara M., Rayaissé J.B., Kagbadouno M., Dama E., Camara O., Traore I.S., Rouamba J., Peyllhard M., Somda M.B., Leno M., Lehane M.J., Torr S.J., Solano P., Jamonneau V. and Bucheton B. (2015). Reducing human-tsetse contact significantly enhances the efficacy of sleeping sickness active screening campaigns : a promising result in the context of elimination. PLoS Neglected Tropical Diseases, 9 (8), e0003727. doi: 10.1371/journal.pntd.0003727.

Dama E., Cornelie S., Camara M., Somda M.B., Poinsignon A., Ilboudo A., Elanga E., Jamonneau V., Solano P., Remoue F., Bengaly Z., Belem A.M.G. and Bucheton B. (2013a). *In silico* identification of a candidate synthetic peptide (Tsgf1₁₈₋₄₃) to monitor human exposure to tsetse flies in West Africa, PLoS Neglected Tropical Diseases, 7, e2455.

Dama E., Cornelie S., Somda M.B., Camara M., Kambiré R., F., C., Jamonneau V., Demette E., Seveno M., Bengaly Z., Solano P., Poinsignon A., Remoue F., Belem A.M.G. and Bucheton B. (2013b). Identification of *Glossina palpalis gambiensis* specific salivary antigens : towards the development of a serologic biomarker of human exposure to tsetse flies in West Africa, Microbes and Infection, 15, 416-427.

Desquesnes M. and Dia M.L. (2004). Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. Veterinary Parasitology, 119 (1), 9-19.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Le Mire J., Toto J.C., Foumane V., Dos-Santos M.A., Sembene M., Fortes F., Simondon F., Carnevale P. and Remoue F. (2010). Human antibody responses to the *Anopheles* salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of ITNs in malaria vector control, PLoS One, 5, e15596.

Duvallet G., Frézil J.-L. and Itard J. (2003). Trypanosomoses : agents pathogènes, Principales maladies infectieuses et parasitaires du bétail. Europe et régions chaudes, Maladies bactériennes, mycoses, maladies parasitaires (Eds P, C, Lefèvre, J, Blancou, R, Chermette), Editions Médicales Internationales, Lavoisier, Paris (France).

Fontaine A., Diouf I., Bakkali N., Misse D., Pages F., Fusai T., Rogier C. and Almeras L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. Parasites and Vectors, 4 (1), 2-17. doi: 10.1186/1756-3305-4-187.

Kagbadouno M.S., Camara M., Bouyer J., Courtin F., Onikoyamou M.F., Schofield C.J. and Solano P. (2011). Progress towards the eradication of tsetse from the Loos islands, Guinea, Parasites and Vectors 4, 2-9.

Lane R.S., Moss R.B., Hsu Y. P., Wei T., Mesirov M. L. and Kuo M. M. (1999). Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 61 (5), 850-859. doi: 10.4269/ajtmh.1999.

Ndille E., Doucoure S., Damien G., Mouchet F., Drame P.M., Cornelie S., Noukpo H., Yamadjako S., Djenontin A., Moiroux N., Misse D., Akogbeto M., Corbel V., Henry M.C., Chandre F., Baldet T. and Remoue F. (2012). First attempt to validate

- human IgG antibody response to Nterm-34kDa salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* bites, PLoS Neglected Tropical Diseases, 6, e1905.
- Rayaisse J.B., Courtin F., Mahamat M.H., Cherif M., Yoni W., Gadjibet N.M.O., Peka M., Solano P., Torr S.J. and Shaw A.P.M. (2020). Delivering 'tiny targets' in a remote region of southern Chad: a cost analysis of tsetse control in the Mandoul sleeping sickness focus, Parasites and Vectors, 13, 1-16.
- Ribeiro J.M., Schneider M. and Guimaraes J.A. (1995). Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*, Biochemical Journal, 308, 243-249.
- Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J.P., Boulanger D. and Simondon F. (2006). Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria, Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 100, 363-370.
- Schwarz A., Helling S., Collin N., Teixeira C.R., Medrano-Mercado N., Hume J.C., Assumpcao T.C., Marcus K., Stephan C., Meyer H.E., Ribeiro J.M., Billingsley P.F., Valenzuela J.G., Sternberg J.M. and Schaub G.A. (2009). Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines, PLoS Neglected Tropical Diseases, 3, e532.
- Sima M., Ferencova B., Bhattacharyya T., Miles M.A., Litvinov S.V., Hailu A., Baneth G. and Volf P. (2019). Synthetic peptides as a novel approach for detecting antibodies against sand fly saliva, PLoS Neglected Tropical Diseases, 13, e0007078.
- Sokal R.R. and Rohlf J.F. (1981). Biometry: the principals and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman, New York, 859p.
- Somda M.B., Bengaly Z., Dama E., Poinsignon A., Dayo G. K., Sidibe I., Remoue F., Sanon A. and Bucheton B. (2013). First insights into the cattle serological response to tsetse salivary antigens: a promising direct biomarker of exposure to tsetse bites, Veterinary Parasitology, 197, 332-340.
- Somda M.B., Cornelie S., Bengaly Z., Mathieu-Daudé F., Poinsignon A., Dama E., Bouyer J., Sidibe I., Demette E., Remoue F., Seveno M., Sanon A. and Bucheton B. (2016). Identification of a Tsall₅₂₋₇₅ salivary synthetic peptide to monitor cattle exposure to tsetse flies, Parasites and Vectors, 149, 1-12.
- Souvenir Zafindrajaona P., Zeuh V. and Moazami-Goudarzi K.E.A. (1999). Study on the phylogenetic status of Lake Chad Kuri cattle using molecular markers, Revue d'Élevage et de Médecine vétérinaire des Pays tropicaux, 52, 155-162.
- Souza A.P., Andrade B.B., Aquino D., Entringer P., Miranda J.C., Alcantara R., Ruiz D., Soto M., Teixeira C.R., Valenzuela J.G., de Oliveira C.I., Brodskyn C.I., Barral-Netto M. and Barral A. (2010). Using recombinant proteins from *Lutzomyia longipalpis* saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas, PLoS Neglected Tropical Diseases, 4, e649.
- Van Nieuwenhove L., Büscher P., Balharbi F., Humbert M., Dieltjens T., Guisez Y. and Lejon V. (2012). Identification of mimotopes with diagnostic potential for *Trypanosoma brucei gambiense* variant surface glycoproteins using human antibody fractions, PLoS Neglected Tropical Diseases, 6, e1682.
- Vlkova M., Rohousova I., Hostomska J., Pohankova L., Zidkova L., Drahota J., Valenzuela J.G. and Volf P. (2012). Kinetics of Antibody Response in BALB/c and C57BL/6 Mice Bitten by *Phlebotomus papatasi*, PLoS Neglected Tropical Diseases, 6, e1719.
- Vreysen M.J., Seck M.T., Sall B. and Bouyer J. (2013). Tsetse flies: Their biology and control using area-wide integrated pest management approaches, Journal of Invertebrate Pathology, 112, S15-S25.