

# Recrutement d'un doctorant (financement Région Occitanie) sur un projet de recherche entre 2 laboratoires (IRSD et PharmaDev) LipiLeish

Les **leishmanioses** sont des maladies chroniques à transmission vectorielle, due à une vingtaine d'espèces de protozoaires flagellés appartenant au genre *Leishmania* et transmises par la piqûre de certaines espèces de Phlébotomes. Ce sont des infections parasitaires de l'espèce humaine et de nombreuses autres espèces de mammifères. Leur incidence est actuellement de 2 millions de nouveaux cas humains par an. La répartition géographique des leishmanioses dépend de celle des phlébotomes vecteurs et des mammifères réservoirs. En 2007, les leishmanioses, maladies parasitaires **tropicales** et des **zones tempérées** (en particulier de **toute la bordure méditerranéenne**), sont endémiques dans 88 pays, en 2012 dans 98 pays, et le nombre croissant de cas est certainement sous-estimé. La lutte contre la leishmaniose par des approches traditionnelles (contrôle des vecteurs et traitement des patients) se heurte principalement **i)** à la difficulté d'identifier de nouvelles molécules capables de supporter le processus industriel, **ii)** au développement rapide de résistances aux médicaments et **iii)** au manque d'accès aux médicaments actifs dans certaines zones. Ces questions sont au cœur des préoccupations de l'OMS concernant le contrôle des maladies tropicales (AG de l'OMS, mai 2013). Il est nécessaire d'améliorer les connaissances fondamentales sur cette maladie par une approche originale concernant les modifications supportées par le parasite lors de ses changements phénotypiques conduisant aux stades parasitaires infectant pour les cellules hôtes vertébrées.

Les leishmanioses ont donc des expressions cliniques variables, en fonction des espèces de Leishmanies infestant l'humain. Le passage d'un Insecte vecteur (*Phlebotomus sp.*) à un Vertébré hôte (l'humain, en particulier) est associé à des changements très importants de voies métaboliques complexes. Parmi celles-ci, **le métabolisme des lipides** joue un rôle crucial dans le stockage de l'énergie, la fluidité de la membrane, la survie du parasite chez son nouvel hôte, et est même lié à la spécificité d'hôte. Les acides gras (FA) sont des composants structurels essentiels qui agissent également comme précurseurs de métabolites biologiquement actifs principalement à partir des acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que les acides arachidonique (AA), docosahexaénoïque (DHA), eicosapentaénoïque (EPA) et linoléique (LA)<sup>1</sup>.

Des résultats préliminaires ont été obtenus sur les métabolites des AGPI chez *L. infantum* par chromatographie liquide couplée à la MS en tandem<sup>2</sup>. Le cycle de vie de *Leishmania* est divisé en trois grandes étapes, **i) promastigote procyclique** dans l'estomac du Phlébotome sans capacité d'infection. Au cours de la métacyclogenèse, le parasite atteint un deuxième stade **ii) promastigote métacyclique** dans les pièces buccales du vecteur et acquiert la capacité d'infecter l'hôte Vertébré. Enfin, le troisième stade, **iii) l'amastigote**, qui est la

---

<sup>1</sup> Ariel, A. & Serhan, C.N. Resolvins and protectins in the termination program of acute inflammation. *Trends Immunol.* **28**, 176-183 (2007).

<sup>2</sup> Le Faouder, P. et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **932**, 123-33 (2013).

forme pathogène, est présent à l'intérieur des macrophages de l'hôte Vertébré<sup>3</sup>. Le partenaire 1 maîtrise ces différentes étapes in vitro pour obtenir une culture pure de promastigote procyclique, de promastigote métacyclique et d'amastigote<sup>4</sup>.

La quantification des métabolites d'AGPI a révélé la présence de plusieurs lipides bioactifs dans les trois stades des parasites. Ces métabolites étaient des produits d'hydroxylation de LA (9-HODE et 13-HODE), AA (5-HETE, 15-HETE, 8-HETE et 12-HETE) et DHA (14-HDoHE et 17-HDoHE). La quantité de tous ces métabolites lipidiques a diminué dans l'amastigote. Il est intéressant de noter que dans le promastigote métacyclique, l'état infectieux, le 14-HDoHE et le 17-HDoHE ont été augmentés par rapport au promastigote procyclique. Ces deux métabolites sont des précurseurs de plusieurs lipides bioactifs impliqués dans la **résolution de l'inflammation** : La 17-HDoHE est le précurseur des resolvines de la série D et la 14-HDoHE des maresines. Le traitement de macrophages avec des lipides extraits des formes infectieuses du parasite ont conduit à la polarisation du macrophage en phénotype M2 (résolution de l'inflammation) et bloqué la différenciation du macrophage en phénotype M1 induite par l'IFN. En conclusion, les métabolites d'acides gras polyinsaturés de *L. infantum*, sont impliqués dans les interactions parasite/hôte en favorisant la polarisation des macrophages en un phénotype M2 pro-résolutif et donc favorisant probablement la multiplication du parasite.

L'infection ciblée par le projet Lipileish est donc une maladie qui sévit en zone tropicale, mais aussi sur l'ensemble du pourtour méditerranéen, et en particulier dans l'étage des forêts sèches méditerranéennes, dont une grande partie est retrouvée, en France, dans la région Occitanie. Par ailleurs (Ph Jacquiet, ENVT, communication personnelle) on note chez le chien qui est l'autre hôte mammifère de ces régions, une extension vers le nord-Ouest au sein de cette région, sans doute parallèle au réchauffement climatique et à l'extension (ou au déplacement) de la zone optimale de vie des Phlébotomes.

### ○ Plan de réalisation

Le travail du doctorant se divisera en deux grandes étapes :

**Caractérisation des enzymes du métabolisme lipidique chez les parasites pendant le cycle** : Des résultats préliminaires obtenus par les partenaires ont mis en évidence l'implication de trois protéines identifiées dans la synthèse de certains métabolites, mais pas de tous. Afin de renforcer ces données préliminaires et d'identifier de nouvelles enzymes, des mutants de *Leishmania* pour les gènes codant pour les enzymes du métabolisme des AGPI (listés dans la base de données de *Leishmania* : GeneDB) seront générés en utilisant le système CRISPR-Cas9, validé pour *Leishmania* en 2015<sup>5</sup>. Le criblage, l'essai inhibiteur et la caractérisation de ces activités enzymatiques seront effectués. Des études analogues seront effectuées sur différentes espèces de *Leishmanies* responsables d'expression cliniques différentes de la maladie. Ce travail portera sur *L. infantum* (modèle de départ) et *L.*

---

<sup>3</sup> Zilberstein, D. & Shapira, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol* **48**, 449-70 (1994).

<sup>4</sup> Lefevre, L. et al. LRH-1 mediates anti-inflammatory and antifungal phenotype of IL-13-activated macrophages through the PPAR $\gamma$  ligand synthesis. *Nat Commun* **6**, 6801 (2015)

<sup>5</sup> Sollelis, L. et al. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. *Cell Microbiol* **17**, 1405-12 (2015).

*donovani* (agents responsables de LV), *L. amazonensis* et *L. guyanensis* (agents responsables de LCV) et sur *L. major* et *L. tropica* (agents responsables de LC) et sera développé, partiellement, en collaboration avec une équipe québécoise (*Maritza Jaramillo, INRS, Centre Armand Frapier, Laval, Quebec*) dont la venue à Toulouse dans le cadre des rencontres franco-québécoise en octobre a été fructueuse.

- **Interaction des parasites avec des macrophages humains** : Comme dans les expérimentations préliminaires, l'effet des lipides extraits du parasite (aux stades infectieux et non infectieux) sera évalué sur des macrophages humains<sup>6</sup>. Nous explorerons les conséquences de l'application directe des lipides du parasite sur des macrophages en culture et plus particulièrement sur leur activation (phagocytose, production de cytokines, métabolites d'AGPI et production d'espèces réactives de l'oxygène, expression de molécules accessoires immunitaires) et analyserons les variations dans leur polarisation. De plus, nous caractériserons le phénotype et le lipidome de macrophages infecté par des parasites axéniques de *L. infantum*, la forme pathogène, les variations de ce lipidome au cours du cycle devraient éclairer sur les rôles respectifs des deux composantes du couple.

## 2. Présentation des Encadrants

**A. Valentin** (PU-PH UPS, UMR-D 152) est responsable de l'équipe « BIOCID » au sein de l'UMR 152. Il maîtrise les modèles expérimentaux de *Leishmania* nécessaires. Ces modèles sont disponibles au laboratoire autant in vitro qu'in vivo. Ce partenaire aura la charge de caractériser les voies enzymatiques impliquée dans le métabolisme des lipides du parasite et sera en charge des expériences d'infection, ainsi que de la mise en culture des différentes espèces de *Leishmanies*.

**N. Cénac** (DR Inserm, IRSD, UMR 1220) est un chef de file en pharmacologie de l'inflammation au niveau du site toulousain. Il a une forte expérience dans les domaines de la fonction et de la quantification des lipides bioactifs et a reçu le prix du jeune chercheur de l'European Workshop on Lipids mediator. Il a développé de nouvelles méthodes en spectrométrie de masse pour quantifier les lipides bioactifs. De plus, il a démontré leur importance dans la communication hôte/micro-organisme. Il sera en charge de l'identification et de la quantification des lipides bioactifs et de la détermination de leur voie de signalisation, et ce, en particulier pour les différentes espèces de *Leishmanies*.

### Complémentarité

LipiLeish est un projet à la jonction entre le **métabolisme lipidique** et la **relation hôte-parasite**, le doctorant sera co-encadré par les partenaires afin de répondre aux besoins décrits. Il/elle collaborera régulièrement avec le personnel des 2 laboratoires impliqués dans le projet. Ces partenaires et leurs connexions internationales et nationales forment un consortium collaboratif compétitif avec une opportunité unique de décrypter l'effet des produits du métabolisme lipidique parasitaire sur la relation hôte-parasite dans le modèle *Leishmania*.

### Publications de chacun des encadrants permettant de comprendre le contexte

**Pour A Valentin** : Paloque L, et al. J Lipid Res. 2019. 60:636-647. Pedron J, et al. ChemMedChem. 2018.13:2217-2228. Lefèvre et al. Immunity 2013. 38:1038-49.

---

<sup>6</sup> Paloque L J Lipid Res. Polyunsaturated fatty acid metabolites: biosynthesis in *Leishmania* and role in parasite/host interaction.2019. 60:636-647.

**Pour N Cenac** : Paloque L, et al. J Lipid Res. 2019. 60:636-647. Bautzova T, et al. Sci Signal. 2018. 11(561). Pérez-Berezo T, et al. Nat Commun. 2017. 8(1):1314.

### 3. Présentation de la thèse

- Programme de travail.

A ce stade, en tenant compte des incertitudes temporelles liées à la culture cellulaire, on peut estimer que la première année (12 m) sera consacrée à la maîtrise des techniques de culture/synchronisation/différenciation des différentes espèces de *Leishmanies*. Les macrophages de lignée et du maintien des cellules humaines en culture court terme seront aussi assurés. Une phase d'acquisition des techniques d'extraction et de caractérisation des lipides bio actifs et de la mesure de leur activité sur les macrophages sera ensuite nécessaire (6 m) puis les évaluations de leurs effets et les confirmations des résultats (12 m). Enfin, les 6 derniers mois seront consacrés à la rédaction des travaux (articles et thèses).

- Qualités attendus

Au-delà d'une formation de haut niveau en biologie cellulaire et moléculaire, le-la candidat-e devra faire preuve de maturité scientifique et d'une forte autonomie pour assurer le suivi de ce projet dichotomique mené dans deux laboratoires. Des points d'étapes hebdomadaires seront organisés par les deux encadrants avec un suivi du travail laissant cependant une large place à l'autonomie.

- Perspectives professionnelles pour le doctorant

L'acquisition de module de formation proposés par l'Ecole des docteurs, d'une part, et l'association de compétences en biologie, pharmacologie, biologie moléculaire et bio-informatique devrait permettre au doctorant, après un stage post-doctoral à l'INRS à Laval (Québec), par exemple, de développer un profil professionnel orienté soit vers les groupes industriels de recherche de médicaments, soit vers une carrière académique dans les grands centres de recherche associant les domaines de compétences cités plus haut.

- Lien de la thèse avec d'autres projets structurants locaux, nationaux, internationaux

Ce travail s'inscrit, au niveau local, dans une série de projets portés par l'UMR 152 et visant à mettre en évidence de nouvelles cibles pharmacologiques chez *Leishmania sp.*, un parasite potentiellement favorisé, dans son extension dans la région Occitanie, par le réchauffement climatique. Par ailleurs, au niveau mondial, les leishmanioses font partie des maladies tropicales négligées pour lesquelles un effort doit être effectué par les structures académiques, autant sur la compréhension de leur pathogénicité que des la mise en évidence de cibles pharmacologiques : ces deux objectifs (<https://www.dndi.org/diseases-projects/leishmaniasis/>) sont retrouvés dans le projet.

Contacts :

**A Valentin** : alexis.valentin@univ-tlse3.fr

**N Cenac** : nicolas.cenac@inserm.fr