



**HAL**  
open science

# Rôle des acides gras polyinsaturés et du phospholipide bis(monoacylglycéro)phosphate dans l'infection à *Leishmania infantum*

Marine Leroux

► **To cite this version:**

Marine Leroux. Rôle des acides gras polyinsaturés et du phospholipide bis(monoacylglycéro)phosphate dans l'infection à *Leishmania infantum*. Parasitologie. Université de Lyon, 2022. Français. NNT : 2022LYSE1033 . tel-04497810

**HAL Id: tel-04497810**

**<https://theses.hal.science/tel-04497810v1>**

Submitted on 11 Mar 2024

**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.



N°d'ordre NNT : 2022LYSE1033

## **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON**

Opérée au sein de  
**L'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N°ED 205**  
**École Doctorale Interdisciplinaire Sciences Santé**

**Spécialité / discipline de doctorat** : Parasitologie- biochimie

Soutenue publiquement le 10/03/2022, par :  
**Marine LEROUX**

---

# **Rôle des acides gras polyinsaturés et du phospholipide bis(monoacylglycéro)phosphate dans l'infection à *Leishmania infantum***

---

Devant le jury composé de :

**Pr MARCHAL Thierry**, Professeur VétagroSup Lyon / Président du jury  
**Pr LOISEAU Philippe**, Professeur à l'Université Paris Saclay / Rapporteur  
**Dr SERENO Denis**, Chargé de Recherche IRD / Rapporteur  
**Dr TOMASETTO Catherine**, Directeur de Recherche INSERM / Rapporteuse  
**Dr MEBAREK Saïda**, Maître de Conférences à l'Université Lyon 1 / Examinatrice  
**Dr AZZOUZ-MAACHE Samira**, Maître de Conférences à l'Université Lyon 1 / Directrice de thèse  
**Pr DELTON Isabelle**, Professeure des Universités à l'INSA Lyon / Co-directrice de thèse  
**Pr LAWTON Philippe**, Professeur des Universités à Lyon 1 / Co-directeur de thèse

## *Remerciements*

La thèse c'est un moment particulier d'une vie. C'est faire face à de nombreuses difficultés, apprendre à se connaître, découvrir ses faiblesses, faire partie d'une équipe bienveillante, avec de la joie, parfois de la tristesse mais surtout une merveilleuse expérience.

Après tous ces moments passés ensemble il est temps pour moi de vous remercier chacun et chacune pour m'avoir apporté votre aide, votre soutien et votre expertise.

Un grand merci à mes directrices de thèse, **Samira Azzouz-Maache**, **Isabelle Delton** ainsi que mon directeur **Philippe Lawton**. Samira, merci d'avoir cru en moi, de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein du laboratoire de parasitologie et mycologie médicale devenu récemment le LAGEPP. Je me souviens de notre discussion à propos de la thèse, « finalement tout est possible » ! Merci pour votre aide quotidienne, nos échanges, vos conseils, pour votre temps si précieux, la rédaction du manuscrit, pour être toujours autant passionnée et enjouée vis-à-vis des manipulations comme des travaux de recherche. Isabelle, je te remercie pour ta confiance. Audacieuse, tu t'es lancée dans cette aventure sans même me connaître. Merci pour la qualité de nos discussions scientifiques, pour tes connaissances sur les lipides et le BMP ô combien précieuses, la rédaction du manuscrit ainsi que ta disponibilité malgré la distance. Merci Philippe pour ta confiance et ton soutien. Tous les trois, vous m'avez permis une grande autonomie pendant ces années me permettant de murir tant sur le plan scientifique que personnel.

De profonds remerciements à toi **Marion Guichard** pour tous les moments passés ensemble, ton aide très précieuse pour les manips, ton écoute, ta joie de vivre, ton soutien sans faille et ton petit grain de folie. Travailler avec toi fut un réel plaisir en effet, tu es aussi carré que moi ! Tu es devenue une véritable amie au fur et à mesure de ces années. Pour preuve, tout le monde a remarqué notre lien si spécial. Tu t'es investie dans la recherche, tu as réussi un concours, conclusion tu es capable de grande chose et les prochains stagiaires ou doctorants auront la chance de t'avoir à leurs côtés.

Un grand merci à **Céline Costaz** d'avoir rejoint le train en marche, de m'avoir aidé dans les manip, pour tes connaissances sur le BMP ainsi que pour nos discussions.

Je remercie également **Françoise Hullin-Matsuda** et **Lars Jordheim**, pour leur accompagnement pendant ces années, d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse, d'avoir pris le temps de m'écouter et d'échanger sur mes travaux.

Merci à **Nestor Magnegli** et **Nathalie Allioli** pour leur accueil au laboratoire. Toi Nestor pour les moments du midi passés ensemble, parfois au détour d'anecdotes historiques. Toi Nathalie de m'avoir aidé à assurer l'enseignements des TP aux étudiants.

Je remercie les laggepiens, **Eyad Elmouazen**, **Sandrine Bourgeois** et **Sabrina Nicolas**. Merci Eyad pour ta confiance, ton co-encadrement de mon master 2. C'est sans nul doute un élément déclencheur pour la thèse. J'ai adoré travailler sur le projet du nanovaccin. Merci Sandrine pour les agréables midis passés avec nous. Merci à Greta et Sabrina, à ce jour partis, pour leur gentillesse et leur bienveillance lors de mon arrivée.

Merci aux stagiaires que j'ai encadrés, pour votre confiance, vos travaux ainsi qu'aux autres doctorants du bureau pour les moments de convivialité !

Merci à ma team de sportif : Xavier, Nicolas, Sarah, Océane, Elodie et Fanny pour toute cette sueur déversée. Pour tous ces moments passés à la salle de sport ou en dehors. Xavier, Nico merci pour tous ces cross ensemble à se surpasser et donner le meilleur de nous dans la bienveillance. Merci les filles d'avoir apporté un peu de féminité à cette team. Merci à Alice, pour tes RPM endiablés et tes pump de folie ça m'a beaucoup aidé pendant mes années. J'ai pu évacuer toutes mes frustrations et me vider la tête. Sarah, ma prof préférée, merci pour ton soutien et ta folie. Si j'aime autant le sport c'est parce que je peux le partager avec vous.

A mes amis d'Orléans qui se reconnaîtront, j'ai réussi !

A **Corinne** et **Patrick**, pour votre soutien tout au long de ces années.

A **mes parents**, d'avoir fait de moi la personne que je suis, une battante qui s'est donnée la peine d'arriver jusqu'ici, pour votre aide, votre soutien. Maman, merci de m'écouter râler au téléphone et de me rassurer. Papa, merci pour ton soutien et tes conseils. Merci, également, à mes deux frères **Matthieu** et **Jean** pour votre soutien.

Au moins qui m'a accompagné pour rédiger ma thèse, **Marley**. Merci d'avoir partagé ton appartement et ton plaid avec moi, tu es un petit chat formidable.

Enfin à toi **Paul**, pour m'avoir laissé aller au bout des choses, d'avoir sacrifier une petite partie de ta vie pour nous, pour ton soutien sans faille, ta confiance indestructible, Tout simplement d'avoir cru en moi. Tu es exceptionnel, je te dois beaucoup.

C'est parti pour une nouvelle aventure...

## Résumé

Dans cette thèse nous avons étudié le rôle de deux acides gras polyinsaturés, l'acide arachidonique (AA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA), ainsi que celui du phospholipide bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), sur l'infectivité du parasite *Leishmania infantum*. Nous avons utilisé 2 souches de cette espèce, la souche MON-1, viscérotrope et la souche MON-24, dermatrope.

L'objectif de la première étude a été d'évaluer les conséquences d'un apport accru en AA ou en DHA sur l'infectivité du parasite *Leishmania* et sur sa survie à l'intérieure du macrophage. Les promastigotes des deux souches ont été cultivés dans un milieu témoin ou un milieu supplémenté en AA ou DHA. Ces conditions de supplémentation ont conduit pour les 2 souches, à un enrichissement spécifique en acides gras des lipides du parasite et à une production de métabolites oxygénés dérivés de l'AA et du DHA dont certains sont des régulateurs de l'inflammation. Les promastigotes MON-1 et MON-24 supplémentés en AA, ont montré une infection plus élevée envers les cellules hôtes. La supplémentation en DHA s'accompagne d'une augmentation de l'infectivité de MON-24 mais pas de MON-1.

La seconde étude s'est intéressée au bis(monoacylglycero)phosphate, un phospholipide particulier localisé principalement dans les endosomes tardifs de la cellule hôte. Le BMP a été impliqué dans la régulation du trafic endosomal, la fusion des membranes endosomales et le transport du cholestérol. L'objectif de cette étude a été d'évaluer le rôle du BMP dans l'infection du parasite. Un modèle de supplémentation avec un précurseur du BMP, le dioleoylphosphatidylglycérol (DOPG) a permis d'augmenter par deux la quantité de BMP dans les macrophages J774. Dans les macrophages ainsi enrichis en BMP, l'infectivité est augmentée pour les deux souches, avec un effet majeur sur la survie intramacrophagique.

En conclusion, nos travaux confortent le rôle du métabolisme lipidique dans les interactions hôte/parasite. Les acides gras AA et DHA et leurs dérivés oxygénés chez le parasite d'une part, et le BMP de l'hôte d'autre part, sont en effet capables de moduler l'infectivité des 2 souches de *L. infantum*. D'après l'ensemble de nos observations, il apparaît que l'infectivité de la souche MON-24 est plus sensible à l'environnement lipidique que la souche MON-1, du moins pour les lipides étudiés dans ces travaux, ce qui en fait un bon modèle d'étude.

## *Abstract*

In this thesis, we have studied the role of two polyunsaturated fatty acids, arachidonic acid (AA) and docosahexaenoic acid (DHA), as well as the phospholipid bis(monoacylglycero)phosphate (BMP), on the infectivity of the parasite *Leishmania infantum*. We used two strains of this species, the MON-1 strain, viscerotropic and the MON-24 strain, dermatropic.

The objective of the first study was to assess the consequences of increased intake of AA or DHA on the infectivity of the *Leishmania* parasite and on its survival inside the macrophage. The promastigotes of the two strains were cultured in a control medium or a medium supplemented with AA or DHA. These supplementation conditions led, for both strains, to a specific fatty acid enrichment of the parasite's lipids and to the production of oxygenated metabolites derived from AA and DHA, some of which are regulators of inflammation. The MON-1 and MON-24 promastigotes supplemented with AA, showed higher infection towards the host cells. DHA supplementation is associated to an increase in the infectivity of MON-24 but not of MON-1.

The second study focused on bis(monoacylglycero)phosphate, a particular phospholipid located mainly in the late endosomes of the host cell. BMP has been implicated in the regulation of endosomal trafficking, the fusion of endosomal membranes and the transport of cholesterol. The objective of this study was to assess the role of BMP in the infection of the parasite. A model of supplementation with a precursor of BMP, dioleoylphosphatidylglycerol (DOPG) allowed to increase by two the amount of BMP in J774 macrophages. In BMP enriched macrophages, infectivity is increased for both strains, with a major effect on intramacrophagic survival.

In conclusion, our work confirms the role of lipid metabolism in host / parasite interactions. The AA and DHA fatty acids and their oxygenated derivatives in the parasite on the one hand, and the BMP in the host on the other hand, are indeed able to modulate the infectivity of the 2 strains of *L. infantum*. From all of our observations, it appears that the infectivity of the MON-24 strain is more sensitive to the lipid environment than the MON-1 strain, at least for the lipids studied in this work, which makes a good study model.

## *Mots clés*

*Leishmania infantum*, souche MON-1, souche MON-24, macrophages, acide arachidonique, acide docosahexaénoïque, espèces réactives de l'oxygène, médiateurs lipidiques, bis(monoacylglycero)phosphate

## *Keywords*

*Leishmania infantum*, MON-1 strain, MON-24 strain, macrophages, arachidonic acid, docosahexaenoic acid, reactive oxygen species, lipid mediators, bis(monoacylglycero)phosphate



## *Sommaire*

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>2</b>
<b>RESUME</b> .....	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>6</b>
<b>MOTS CLES</b> .....	<b>7</b>
<b>KEYWORDS</b> .....	<b>7</b>
<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTES DES FIGURES</b> .....	<b>15</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>PARTIE I</b> .....	<b>22</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>22</b>
<b>INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE</b> .....	<b>23</b>
<b>CHAPITRE 1 : GENERALITES SUR LA LEISHMANIOSE</b> .....	<b>26</b>
<b>I. DECOUVERTE ET HISTORIQUE</b> .....	<b>26</b>
<b>II. TAXONOMIE</b> .....	<b>27</b>
<b>III. LA REPARTITION GEOGRAPHIQUE</b> .....	<b>28</b>
1. LES LEISHMANIOSES VISCERALES .....	29
2. LES LEISHMANIOSES CUTANEEES.....	30
<b>IV. BIOLOGIE DES LEISHMANIES</b> .....	<b>31</b>
1. L'ORGANISATION CELLULAIRE .....	31
2. LES DIFFERENTES FORMES DU PARASITE .....	32
a. <i>La forme promastigote</i> .....	32
b. <i>La forme amastigote</i> .....	33
<b>V. LE VECTEUR</b> .....	<b>33</b>
1. MORPHOLOGIE .....	34
2. LE CYCLE DE VIE .....	34
3. HABITAT .....	35

4.	COMPORTEMENT DES PHLEBOTOMES.....	35
<b>VI.</b>	<b>LES RESERVOIRS .....</b>	<b>36</b>
<b>VII.</b>	<b>LES FORMES CLINIQUES.....</b>	<b>38</b>
1.	LA LEISHMANIOSE VISCERALE.....	38
2.	LES LEISHMANIOSES TEGUMENTAIRES .....	39
<b>VIII.</b>	<b>LE CYCLE DE VIE .....</b>	<b>42</b>
<b>IX.</b>	<b>LA METACYCLOGENESE.....</b>	<b>44</b>
<b>X.</b>	<b>LA TRANSFORMATION PROMASTIGOTE-AMASTIGOTE .....</b>	<b>44</b>
1.	LE LPG : LIPOPHOSPHOGLYCANE.....	44
2.	LES GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL (GPI).....	46
3.	LES GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHOLIPIDES (GIPLs) .....	47
4.	LES PROTEOPHOSPHOGLYCANES (PPG).....	47
<b>XI.</b>	<b>LA VACUOLE PARASITOPHORE (VP) .....</b>	<b>48</b>
1.	FORMATION DE LA VACUOLE PARASITOPHORE .....	49
2.	ACQUISITION DES NUTRIMENTS ET CARACTERISTIQUES DES VACUOLES PARASITOPHORES... ..	51
a.	<i>L'arginine</i> .....	52
b.	<i>Le Fer</i> .....	53
c.	<i>Les corps lipidiques</i> .....	54
<b>XII.</b>	<b>LA REPONSE IMMUNITAIRE .....</b>	<b>55</b>
1.	LA REPONSE INNEE .....	55
2.	LA REPONSE ADAPTATIVE .....	55
<b>XIII.</b>	<b>MECANISME DE DEFENSES DES MACROPHAGES.....</b>	<b>57</b>
1.	DOMMAGE OXYDATIF.....	57
2.	MODIFICATION DU METABOLISME DES LIPIDES.....	58
<b>XIV.</b>	<b>MECANISME D'EVASION DE <i>LEISHMANIA</i> .....</b>	<b>59</b>
1.	DIMINUTION DE L'INFLAMMATION .....	59
2.	ÉCHAPPEMENT AUX DOMMAGES DU STRESS OXYDATIF .....	60
<b>XV.</b>	<b>LES METHODES DE DIAGNOSTIC .....</b>	<b>61</b>

1.	DIAGNOSTIC CLINIQUE .....	61
2.	DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE.....	62
a.	<i>Les prélèvements</i> .....	62
•	Leishmaniose viscérale .....	62
•	Leishmaniose cutanée .....	62
b.	<i>La recherche des parasites</i> .....	62
c.	<i>Les méthodes moléculaires</i> .....	63
3.	DIAGNOSTIC IMMUNOLOGIQUE.....	63
a.	<i>Détection d'anticorps</i> .....	64
•	Le test d'agglutination directe (DAT).....	64
•	Le test immunochromatographique (ICT) basé sur rK39 .....	65
b.	<i>Détection d'antigène</i> .....	66
<b>X.</b>	<b>LES TRAITEMENTS.....</b>	<b>67</b>
1.	LES ANTIMONIES PENTAVALENTS .....	67
2.	L'AMPHOTERICINE B.....	67
3.	LA PENTAMIDINE .....	68
4.	LA MILTEFOSINE.....	69
5.	LA PAROMOMYCINE .....	69
6.	AUTRES ANTI-LEISHMANIENS .....	70
a.	<i>Les imidazolés et les triazolés</i> .....	70
b.	<i>L'acide glycyrrhizique</i> .....	70
c.	<i>Immunothérapie</i> .....	70
d.	<i>Méthode physique</i> .....	71
	<b>CHAPITRE 2.....</b>	<b>72</b>
	<b>I. CLASSIFICATION DES LIPIDES.....</b>	<b>72</b>
	<b>II. LES ACIDES GRAS CHEZ L'HOTE .....</b>	<b>73</b>
1.	GENERALITES .....	73
2.	VOIE DE BIOSYNTHESE .....	76
a.	<i>Les acides gras saturés</i> .....	76
b.	<i>Les acides gras insaturés</i> .....	76
3.	DISTRIBUTION, CAPTATION ET INCORPORATION DANS LES LIPIDES CELLULAIRES.....	78
4.	ROLE STRUCTURAL DES AGPI.....	79

5.	AGPI D'INTERETS : L'ACIDE ARACHIDONIQUE ET L'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE .....	79
a.	<i>L'acide arachidonique</i> .....	79
b.	<i>L'acide docosahexaénoïque</i> .....	80
6.	METABOLISME OXYGENE DE L'AA ET DU DHA .....	82
a.	<i>Les phospholipases</i> .....	82
b.	<i>Les lipoxygénases</i> .....	85
c.	<i>Les cyclooxygénases</i> .....	85
7.	METABOLISME OXYGENE DE L'ACIDE ARACHIDONIQUE .....	86
a.	<i>Les acides gras mono-hydroxylés</i> .....	86
b.	<i>Les leucotriènes</i> .....	87
c.	<i>Les lipoxines</i> .....	88
d.	<i>Les prostanoïdes</i> .....	89
•	<i>Les prostaglandines</i> .....	89
•	<i>Les thromboxanes</i> .....	90
8.	METABOLISME OXYGENE DE L'ACIDE DOCOSAHEXAENOÏQUE.....	90
a.	<i>Les acides gras mono-hydroxylés</i> .....	90
b.	<i>Les SPM</i> .....	91
•	<i>Les protectines</i> .....	91
•	<i>Les marésines</i> .....	92
•	<i>Les résolvines (RvDs)</i> .....	93
9.	ROLE DES METABOLITES OXYGENES CHEZ L'HOTE .....	94
<b>III.</b>	<b>LE BMP</b> .....	<b>95</b>
1.	STRUCTURE .....	95
2.	LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS DU BMP.....	96
3.	METABOLISME DU BMP .....	97
a.	<i>Synthèse</i> .....	97
b.	<i>Catabolisme</i> .....	98
4.	DISTRIBUTION, LOCALISATION .....	99
5.	ROLE CELLULAIRE.....	99
a.	<i>Biogenèse et dynamique des vésicules endocytiques</i> .....	99
b.	<i>Trafic du cholestérol</i> .....	100
c.	<i>Infection virale</i> .....	102
d.	<i>Autres fonctions cellulaires du BMP</i> .....	103

<b>IV.</b>	<b>LES ACIDES GRAS CHEZ LES TRYPANOSOMATIDES .....</b>	<b>104</b>
1.	COMPOSITION EN ACIDES GRAS DES PARASITES <i>LEISHMANIA</i> .....	104
2.	VOIE DE SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS CHEZ <i>LEISHMANIA</i> .....	104
	<i>a. Les AG saturés</i> .....	104
	<i>b. Les AG insaturés et polyinsaturés</i> .....	105
3.	MECANISME DE CAPTATION DES ACIDES GRAS .....	106
4.	LE RÔLE DES ACIDES GRAS .....	108
	<i>a. Fournisseur d'énergie et matériel de stockage</i> .....	108
	<i>b. Rôle dans l'entrée et la survie des parasites dans les macrophages</i> .....	108
	•Modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte .....	108
	•La myristoylation .....	109
	<i>c. Dans la différenciation promastigote/amastigote</i> .....	110
	<i>d. La résistance aux médicaments</i> .....	111
<b>V.</b>	<b>AUTRES LIPIDES IMPORTANTS CHEZ <i>LEISHMANIA</i> .....</b>	<b>111</b>
1.	LES PHOSPHOLIPIDES ET LES SPHINGOLIPIDES. ....	111
	<i>a. Le rôle des phospholipides</i> .....	112
2.	LES STEROLS .....	113
	<i>a. Le cholestérol</i> .....	113
	•Structure .....	113
	•Cholestérol et <i>Leishmania</i> .....	114
	<i>b. L'ergostérol</i> .....	115
	•Structure .....	115
	•Biosynthèse .....	116
	•Rôle dans la virulence du parasite .....	117
	<b>PARTIE II.....</b>	<b>119</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>119</b>
	<b>ÉTUDE 1 : ÉTUDE DE L'IMPACT DES ACIDES GRAS. ....</b>	<b>120</b>
1.	CULTURE DES PARASITES .....	120
2.	CULTURES DES MACROPHAGES .....	120
3.	SUPPLEMENTATION DES PROMASTIGOTES AVEC LES ACIDES GRAS .....	120
4.	ANALYSE DES ACIDES GRAS DES LIPIDES TOTAUX EXTRAITS DES PROMASTIGOTES .....	121

5.	ANALYSE DES METABOLITES OXYGENES .....	121
6.	ÉVALUATION DE L'INFECTIVITE DES PARASITES .....	122
a.	<i>Comptage des parasites intracellulaires</i> .....	122
b.	<i>Mesure des espèces réactives oxygénés dans les macrophages J774</i> .....	123
<b>ÉTUDE 2 : ÉTUDE DE L'IMPACT DU BMP</b> .....		<b>124</b>
1.	PREPARATION DES LIPOSOMES .....	124
2.	SUPPLEMENTATION DES MACROPHAGES J774 EN PG .....	124
3.	INFECTION DES MACROPHAGES .....	124
4.	ANALYSE DU BMP DANS LES MACROPHAGES ET LES PROMASTIGOTES .....	125
a.	<i>Identification des espèces moléculaires du BMP par LC-MS</i> .....	125
b.	<i>Immunofluorescence</i> .....	126
c.	<i>Microscopie à transmission</i> .....	126
<b>PARTIE III</b> .....		<b>128</b>
<b>RESULTATS</b> .....		<b>128</b>
<b>ÉTUDE 1 : ÉTUDE DE L'IMPACT DES ACIDES GRAS</b> .....		<b>129</b>
<b>ÉTUDE 2 : ÉTUDE DE L'IMPACT DU BMP DANS L'INFECTION</b> .....		<b>158</b>
<b>I. INTRODUCTION</b> .....		<b>158</b>
<b>II. RESULTATS</b> .....		<b>159</b>
1.	CARACTERISATION DU BMP DANS LES PROMASTIGOTES ET DANS LES MACROPHAGES INFECTES .....	159
a.	<i>Mise en évidence du BMP des promastigotes par immunofluorescence</i> .....	159
b.	<i>Mise en évidence du BMP dans les promastigotes et amastigotes intramacrophagiques par microscopie électronique à transmission</i> .....	161
c.	<i>Caractérisation biochimique du BMP dans les promastigotes de Leishmania</i> .....	162
2.	CONSEQUENCES D'UN ENRICHISSEMENT EN BMP SUR L'INFECTION DES MACROPHAGES	162
a.	<i>Effet de la supplémentation en DOPG ou DPPG sur l'infection</i> .....	163
•	<i>Après 2h d'infection (association)</i> .....	163
•	<i>Après 24h d'infection</i> .....	165
•	<i>Après 24h d'infection et 24h supplémentaire en culture (survie)</i> .....	166
b.	<i>Effet de la supplémentation en DOPG sur la quantité de BMP dans les macrophages J774</i> .....	167

<b>III. DISCUSSION .....</b>	<b>169</b>
<b>PARTIE IV .....</b>	<b>174</b>
<b>DISCUSSION GENERALE, CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>174</b>
<b>PARTIE V .....</b>	<b>180</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>180</b>
<b>ANNEXE I : ORP ET INFECTION.....</b>	<b>181</b>
<b>I. INTRODUCTION.....</b>	<b>181</b>
<b>II. MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>182</b>
1. CULTURE DES PROMASTIGOTES .....	182
2. CULTURE DES MACROPHAGES .....	183
3. INFECTION DES MACROPHAGES .....	183
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>183</b>
1. MISE AU POINT DE L'INFECTION DES RAW vs RAW NT .....	183
2. EFFET DE L'ORP 11-/- SUR L'INFECTION .....	186
a. <i>Après 2h d'infection</i> .....	186
b. <i>Après 24h d'infection</i> .....	187
c. <i>Évaluation de la survie intramacrophagique</i> .....	189
<b>IV. CONCLUSION.....</b>	<b>189</b>
<b>V. DISCUSSION .....</b>	<b>190</b>
<b>ANNEXE II : ÉTUDE D'UN NANOVACCIN ORALE CONTRE L'ÉCHINOCOCCOSE.....</b>	<b>192</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>225</b>

## *Listes des figures*

<b>Figure 1.</b> Classification du genre <i>Leishmania</i> (d'après OMS).....	28
<b>Figure 2.</b> Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde (WHO, 2016). .....	30
<b>Figure 3.</b> Distribution de la leishmaniose cutanée dans le monde (WHO, 2016). .....	31
<b>Figure 4.</b> Représentation schématique de l'organisation cellulaire de <i>Leishmania</i> (d'après T.Duriez) .....	32
<b>Figure 5.</b> Forme promastigote du parasite <i>Leishmania</i> . .....	32
<b>Figure 6.</b> Forme amastigote de <i>Leishmania</i> . .....	33
<b>Figure 7.</b> Phlébotome Phlébotomus (à gauche) et Phlébotome Lutzomyia (à droite).....	33
<b>Figure 8.</b> Schéma représentatif du cycle de vie du phlébotome (fleatickrisk.com). .....	34
<b>Figure 9.</b> Manifestations cliniques de la leishmaniose viscérale chez des enfants (Chappuis et al., 2007).....	39
<b>Figure 10.</b> Manifestations cliniques de la leishmaniose cutanée. (A) Petites papules rouges dues à <i>L. infantum</i> à Majorque. (B) Nodule hyperkératosique dû à <i>L. tropica</i> en Afghanistan. (C) Ulcération due à <i>L. major</i> en Afghanistan (Bailey and Lockwood, 2007). .....	40
<b>Figure 11.</b> Représentation clinique de la leishmaniose cutanéomuqueuse (santépublique.fr). .....	42
<b>Figure 12.</b> Cycle de vie de <i>Leishmania</i> (Burza et al., 2018). .....	43
<b>Figure 13.</b> Représentation schématique d'un promastigote avec les différentes molécules de surfaces ancrées au GPI : gp63, LPG, PPG, GIPL (Olivier et al., 2012). .....	45
<b>Figure 14.</b> Formation de la vacuole parasitophore de <i>Leishmania</i> dans le macrophage (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). .....	51
<b>Figure 15.</b> Modèle de composition de la membrane de la vacuole parasitophore de <i>Leishmania</i> (Young and Kima, 2019). .....	52
<b>Figure 16.</b> Test d'agglutination directe (Chappuis et al., 2007).....	65
<b>Figure 17.</b> Le test immunochromatographique basé sur rK39 (Chappuis et al., 2007).....	65
<b>Figure 18.</b> Classification des lipides.....	72
<b>Figure 19.</b> Constituants de la membrane cellulaire. ....	73
<b>Figure 20.</b> Nomenclature des acides gras (Guesnet et al., 2005). .....	73
<b>Figure 21.</b> Classification des acides gras (Guesnet et al., 2005). .....	74
<b>Figure 22.</b> Voie de biosynthèse des APGI n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI essentiels.....	77



<b>Figure 23.</b> Structure de l'acide phosphatidique.....	78
<b>Figure 24.</b> Structure de l'acide arachidonique.....	80
<b>Figure 25.</b> Structure du DHA. ....	81
<b>Figure 26.</b> Voie de synthèse de certains métabolites oxygénés dérivés de l'AA et du DHA. .	82
<b>Figure 27.</b> Libération des AGPI à partir des glycérophospholipides par action de la phospholipase A2. ....	83
<b>Figure 28.</b> Libération des acides gras par les phospholipases C. ....	84
<b>Figure 29.</b> Métabolites mono-hydroxylés à partir de l'AA. ....	87
<b>Figure 30.</b> Voie de synthèse des leucotriènes à partir de l'AA. ....	87
<b>Figure 31.</b> Voie de synthèse des lipoxines à partir de l'AA. ....	88
<b>Figure 32.</b> Voie de synthèse des prostaglandines à partir de l'AA. ....	89
<b>Figure 33.</b> Voie de synthèse des thromboxanes à partir de l'AA. ....	90
<b>Figure 34.</b> Voie de synthèse des AG monohydroxylés à partir du DHA. ....	91
<b>Figure 35.</b> Synthèse des protectines à partir du DHA via la 15-LOX. ....	92
<b>Figure 36.</b> Synthèse des marésine à partir du DHA via la 12-LOX. ....	93
<b>Figure 37.</b> Synthèse des marésines à partir du DHA via la 15-LOX. ....	94
<b>Figure 38.</b> Structure du BMP et du phosphatidylglycérol (Hullin-Matsuda et al., 2009). ....	96
<b>Figure 39.</b> Voie de synthèse du BMP (Amidon et al., 1996). ....	98
<b>Figure 40.</b> Biosynthèse des acides gras insaturés chez <i>Leishmania spp.</i> ....	106
<b>Figure 41.</b> Sources d'acides gras pour les trypanosomatidés (Uttaro, 2014). ....	107
<b>Figure 42.</b> Représentation des différentes classes de lipides chez <i>Leishmania</i> (Zhang and Beverley, 2010). ....	112
<b>Figure 43.</b> Structure du cholestérol. ....	114
<b>Figure 44.</b> Structure de l'ergostérol. ....	116
<b>Figure 45.</b> Voie de biosynthèse des stérols de <i>Leishmania</i> (Yao et al ., 2016). ....	117
<b>Figure 46.</b> Observation du BMP dans les promastigotes. ....	160
<b>Figure 47.</b> Observation au microscope électronique à transmission de BMP chez <i>Leishmania</i> . ..	161
<b>Figure 48.</b> Caractérisation biochimique des BMP dans les promastigotes de la souche MON-1. ....	162
<b>Figure 49.</b> Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés. ....	164
<b>Figure 50.</b> Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés ....	166
<b>Figure 51.</b> Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés ....	167
<b>Figure 52.</b> Quantification du OO-BMP (dioleoyl-BMP) et du OO-PG. ....	168

<b>Figure 53.</b> Pourcentage de macrophages infectés entre les RAW 264,7 et les RAW sh NT.	185
<b>Figure 54.</b> Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11-/- et ORP 31-/-.....	186
<b>Figure 55.</b> Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11-/- et ORP 31-/-.....	187
<b>Figure 56.</b> Charge parasitaire chez les macrophages RAW sh ORP 11-/- .....	188
<b>Figure 57.</b> Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11-/- et ORP 31-/-.....	189

## *Listes des tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Caractéristiques des formes cliniques, des principaux réservoirs et de la localisation des différentes espèces de <i>Leishmania</i> .....	37
<b>Tableau 2.</b> Classification et nomenclature des principaux acides gras. ....	75
<b>Tableau 3.</b> Pourcentage de macrophages infectés après supplémentation des macrophages en DOPG ou DPPG et infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24 .....	164
<b>Tableau 4.</b> Pourcentage de macrophages infectés après supplémentation des macrophages en DOPG ou DPPG infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24. ....	165
<b>Tableau 5.</b> Pourcentage de macrophages RAW sh NT et RAW ORP 11-/- infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24.. ....	188

## *Liste des abréviations*

(S)-HpDoHE : Acide hydroperoxydocosahéxaénoïque  
4-HDoHE : Acide 4-hydroxydocosahéxaénoïque

### *A*

AA : Acide Arachidonique  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AG : Acide Gras  
AGMI : Acide Gras mono-insaturés  
AGPI : Acide Gras Polyinsaturés  
AGS : Acide Gras saturés  
ALA : Acide  $\alpha$ -linoléinique  
ARNm: Acide ribonucléique messenger  
At-RvD: Aspirin-trigèrred-RvD

### *B*

BHK: Baby hamster kidney  
BMP: Bis(monoacylglycéro)phosphate

### *C*

CL : Leishmaniose cutanée  
COX : Cyclooxygénase  
cPLA : PLA cytosolique  
CY : Cytochrome

### *D*

DAG : Diacylglycérol  
DAT : Test d'agglutination directe

DHA : Acide docosahéxaénoïque  
DPA : Acide docosapentaénoïque  
D-PDMP : D -thréo-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol  
DTH : Technique d'hypersensibilité retardée

### *E*

ELO : Élongase  
EPA: Acide Eicosapentaénoïque

### *F*

FABP: Fatty acid binding protein  
FAD: Fatty acid desaturase  
FADH<sub>2</sub>: Flavine adénine dinucléotide  
FAS : Fatty acid synthase  
FATP : Fatty Acid Transport Protein

### *G*

GIPL: Glycosylphosphatidylinositol phospholipides  
GL: Glycérolipides  
GLA : Acide  $\gamma$ -linoléinique  
GM-CSF : Facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages  
Gp63 : Glycoprotéine 63  
GPI : glycophosphatidylinositol  
GPx : glutathion peroxydase

GTP : Guanosine triphosphates

## *H*

HDL : Lipoprotéines de haute densité

HETE : Acide hydroxyeicosatétraénoïque

HpETE : Acide

hydroperoxyeicosatétraénoïque

## *I*

ICT : Test immunochromatographie

IL : Interleukine

iPLA : PLA indépendante

## *L*

LA : Acide linoléique

LBPA : Acide lysobisphosphatidique

LDL : Lipoprotéines de basse densité

LOX : Lipoxygénase

LPG : Lysophosphatidylglycérol

LPS : Lipopolysaccharide

LSD : Lysosomal storage disorder

LT : Leucotriènes

LV : Leishmaniose viscérale

LX : Lipoxine

## *M*

MA : Acide myristique

MAG : Monoacylglycérol

MAP : Mitogen activated protein

MaR : Marésines

## *N*

NADPH : Nicotinamide adénine  
dinucléotide phosphate

NMT : protéine *N*-myristoyltransférase

NNN : Navy Neal Nicolle

NO: Oxyde nitrique

NPC : Niemann Pick Type C

## *O*

OA : Acide oléique

## *P*

PA : Acide palmitique

PA : Acide phosphatidique

PBS : Tampon phosphate salin

PC : Phosphatidylcholine

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PD : Protectines

PE : Phosphatidyléthanolamine

PG : Phosphoglycérol

PG : Prostaglandine

pH : Potentiel hydrogène

PI : Phosphatidyllinositol

PKC : Protéine kinase C

PKDL : Leishmaniose post kala azar

PL : Phospholipase

PL : Phospholipides

PLA : Phospholipases

PMN : Polymorphonucléaires

PPG : Protéophosphoglycane

## *R*

RMN : Résonance magnétique nucléaire

RNI : Réactif intermédiaire azoté

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Rv : Résolvines

## *S*

SA : Acide stéarique

SAPs: Sphingolipid activator proteins

SPM: Specialized pro-resolving mediators

SREBP2

SREBP2 : Protéine 2 de liaison des éléments régulateurs des stérols

SVF : Sérum vœu fœtal

## *T*

TA : Transacylation

TG : Triacylglycérols

TLR : Toll like receptor

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor

TX : Thromboxane

## *V*

VL : Leishmaniose viscérale

VP : Vacuole parasitophore

VSV : Virus de la stomatite vésiculeuse

*Partie I*  
*Bibliographie*

## *Introduction et objectifs de l'étude*

Les leishmanioses constituent un complexe de maladies tropicales et subtropicales affectant 12 millions de personnes dans le monde causant 20 000 à 30 000 décès par an. Elles sont causées par des parasites unicellulaires du genre *Leishmania* transmis par un phlébotome vecteur et présentent diverses expressions cliniques (cutanée, muco-cutanée et viscérale). Le cycle de vie de *Leishmania* comporte deux hôtes dans lesquels deux stades parasitaires prolifèrent, le promastigote extracellulaires chez l'insecte vecteur et l'amastigote intracellulaires chez l'hôte mammifère. Lors d'un repas sanguin, le promastigote est inoculé par le vecteur chez l'hôte, notamment l'homme ou le chien. Une fois phagocytés par les macrophages hôtes, ils vont se différencier en amastigotes et se multiplier. Les amastigotes libérés lors de l'éclatement des macrophages infectés infectent à leur tour d'autres macrophages.

L'entrée du parasite *Leishmania* et sa différenciation à l'intérieur du macrophage sont généralement associées à une réorganisation de sa membrane dont les lipides tels que les phospholipides, les glycolipides et les stérols sont des composants majoritaires. Dans la cellule hôte, la membrane plasmique sert de porte d'entrée aux agents pathogènes intracellulaires et des relations complexes sont entretenues entre les parasites et les organites intracellulaires de celle-ci notamment par le biais des vacuoles parasitophores. Différentes études ont pu démontrer l'importance des lipides dans les interactions hôtes-pathogènes notamment dans la différenciation des parasites ainsi que la résistance aux médicaments. En particulier, ont été mis en évidence le rôle majeur du cholestérol de la cellule hôte pour l'entrée du parasite, ainsi que le rôle de certains acides gras dans des mécanismes de résistance (Rakotomanga et al., 2005). Certains traitements de la leishmaniose telles que la miltéfosine et l'amphotéricine B ciblent le métabolisme des lipides, des changements dans la composition des lipides peuvent entraîner une résistance aux médicaments.

Les travaux antérieurs de l'équipe ont eu pour objectif de mettre en évidence les changements majeurs au cours de la différenciation du parasite *Leishmania*, c'est à dire entre les stades promastigotes et les stades amastigotes intramacrophagiques en termes de distributions des lipides et de compositions en acides gras (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017).



Concernant la distribution des lipides, un appauvrissement en ergostérol compensé par un enrichissement significatif en cholestérol a été démontré chez les amastigotes par comparaison aux promastigotes. Par ailleurs, l'analyse de la composition en acides gras a révélé une augmentation significative de la proportion de 20:4 n-6 (acide arachidonique : AA) et 22:6 n-3 (acide docosahexaénoïque : DHA) dans les lipides totaux des amastigotes, en particulier dans les phospholipides, comparativement aux promastigotes. Ces résultats suggèrent que ces acides gras polyinsaturés sont importants lors du processus d'infection des macrophages, mais ne permettent pas de déterminer si l'enrichissement en acides gras observé dans la forme amastigote reflète un mécanisme post- ou pré-infection.

Dans ce contexte, la première partie de mes travaux a eu **pour objectif de tester l'hypothèse selon laquelle les acides gras AA et DHA dans la forme promastigote pourraient faciliter le processus de différenciation et/ou l'infection et le développement intracellulaire du parasite**. Nous avons donc mis au point un protocole de supplémentation en acides gras des lipides des promastigotes de *Leishmania infantum* permettant d'augmenter spécifiquement leur proportion dans les lipides et d'en évaluer l'impact sur l'infectivité. Deux isolats de souches humaines de *L. infantum*, causant la leishmaniose viscérale (MON-1) ou la leishmaniose cutanée (MON-24) ont été utilisés dans cette étude.

Dans la leishmaniose, le mécanisme d'entrée des promastigotes dans les macrophages de l'hôte implique la phagocytose, une endocytose particulière. Cette voie est constituée de différentes vésicules dont les dernières sont les endosomes tardifs et lysosomes. La survie intracellulaire du parasite nécessite une transformation du phagosome en vacuole parasitophore permettant d'échapper aux défenses du macrophage et de constituer un milieu favorable pour sa différenciation. Les vacuoles parasitophores sont des compartiments acides contenant certaines enzymes lysosomales et sont entourées d'une membrane enrichie en protéines endosomales/lysosomales tardives telles que rab7, lamp-1, et lamp-2 (Liévin-Le Moal and Loiseau, 2016; Rodríguez et al., 2011). Des interactions/mécanismes de fusion de la vacuole parasitophore avec le compartiment endosome tardif/lysosome sont nécessaires et les mécanismes sont encore mal caractérisés.

Le bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP), un phospholipide retrouvé spécifiquement dans les endosomes tardifs, est bien décrit pour ses différents rôles dans la biogenèse et la dynamique des vésicules endocytiques, les mécanismes de fusions et les fonctions de tri de endosomes tardifs. Plusieurs travaux antérieurs, dont ceux de l'équipe, ont mis en avant le rôle du BMP dans la régulation de transport intracellulaire du cholestérol, en particulier les voies de redistribution de cholestérol dérivé des LDL depuis les endosomes tardifs vers les autres compartiments cellulaires. Le BMP joue par ailleurs un rôle dans la régulation de la production des oxystérols, dérivés de l'oxydation du cholestérol, dans les macrophages (Arnal-Levron et al., 2019). Ainsi, le BMP régule le transport du cholestérol et celui-ci est essentiel dans l'infection à *Leishmania*. En effet, la phagocytose du parasite dépend des taux normaux de cholestérol présent dans la membrane plasmique (Pucadyil et al., 2004; Pucadyil and Chattopadhyay, 2006). De plus, des études ont mis en évidence la présence de cholestérol au niveau de la vacuole parasitophore (Semini et al., 2017).

Du fait de sa présence dans les endosomes tardifs et ses propriétés fusogènes d'une part, et de son rôle dans la régulation du trafic du cholestérol d'autre part, une hypothèse est que le BMP de la cellule hôte pourrait contrôler l'infection du parasite à différents niveaux : l'internalisation du parasite et/ou la biogenèse de la vacuole parasitophore, ou les mécanismes de transfert de cholestérol. **La deuxième partie de mes travaux a donc eu pour objectif de déterminer l'effet d'un enrichissement en BMP dans les macrophages sur l'infectivité des parasites *Leishmania*. Une étude préliminaire sur la caractérisation du BMP dans les formes promastigotes et amastigotes a aussi été réalisée.**

# Chapitre 1 : Généralités sur la leishmaniose

## I. Découverte et historique

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires très anciennes. Les formes cutanées sont l'une des premières parasitoses décrites. La constatation de ces lésions remonte à la plus haute antiquité aussi bien dans l'Ancien que dans le Nouveau monde tandis que la description des formes viscérales et leur mise en évidence attendra le XIX<sup>ème</sup> siècle. Au X<sup>ème</sup> siècle, un médecin arabe, Al Boukhari, mentionnait déjà cette affection dermatologique tandis qu'Avicenne l'attribuait à une piqûre de moustique. En 1882, la première description clinique moderne est réalisée par McNaugh tandis que trois ans plus tard, Cunnigham découvre les parasites dans un prélèvement de bouton d'Orient (Dedet, 1999).

En 1898, Borovsky, un médecin militaire en Ouzbékistan, mentionne un protozoaire dans des prélèvements d'ulcères sans en déterminer sa taxonomie. Ce même parasite sera étudié par Wright trois ans plus tard chez un enfant arménien vivant à Boston, développant une lésion cutanée qu'il nomma *Helcosoma tropicum*. En 1900, Sir William Leishman fit la découverte du parasite *Leishmania* dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre Dum-Dum en Inde. En 1903, Charles Donovan identifia à son tour le même parasite dans une biopsie de rate. Le parasite fut nommé *Leishmania donovani* en leur honneur- (Robert et Janovy, 2000).

Quelques années plus tard, la première culture fut obtenue par Nicolle et Sicre (Jarry, 1999). Après comparaison des organismes de la peau avec ceux de la rate découverte précédemment en 1903, ils conclurent à une identité similaire du point de vue morphologique entre le parasite de Leishman-Donovan et celui de Wright. Au cours de cette même année, Nicolle et Sicre découvrent ces mêmes protozoaires dans différents animaux tels que le chien, le cheval et enfin le chat. Après cette découverte, ils font de cette affection une maladie commune à l'homme et aux mammifères. Ce n'est qu'en 1921, que les frères Sargent et leurs collaborateurs établissent le rôle de vecteurs des phlébotomes en parvenant à transmettre le « bouton d'orient » par application de broyats de ces insectes sur des scarifications cutanées. La transmission par piqûre ne fut prouvée qu'en 1941 par Adler et Ber (Mazelet, 2004). Cette même année, l'école soviétique avec Latshev et Krjukova met en évidence le rôle des rongeurs en tant que réservoirs des leishmanioses (Steverding, 2017).

Dès 1982, l'OMS a adopté la caractérisation isoenzymatique des parasites. En 1985 les premiers cas de co-infections VIH-Leishmanies sont signalés et depuis les recherches ne cessent de progresser. Malgré cela, ces pathologies demeurent de graves problèmes de santé dans plusieurs régions du monde.

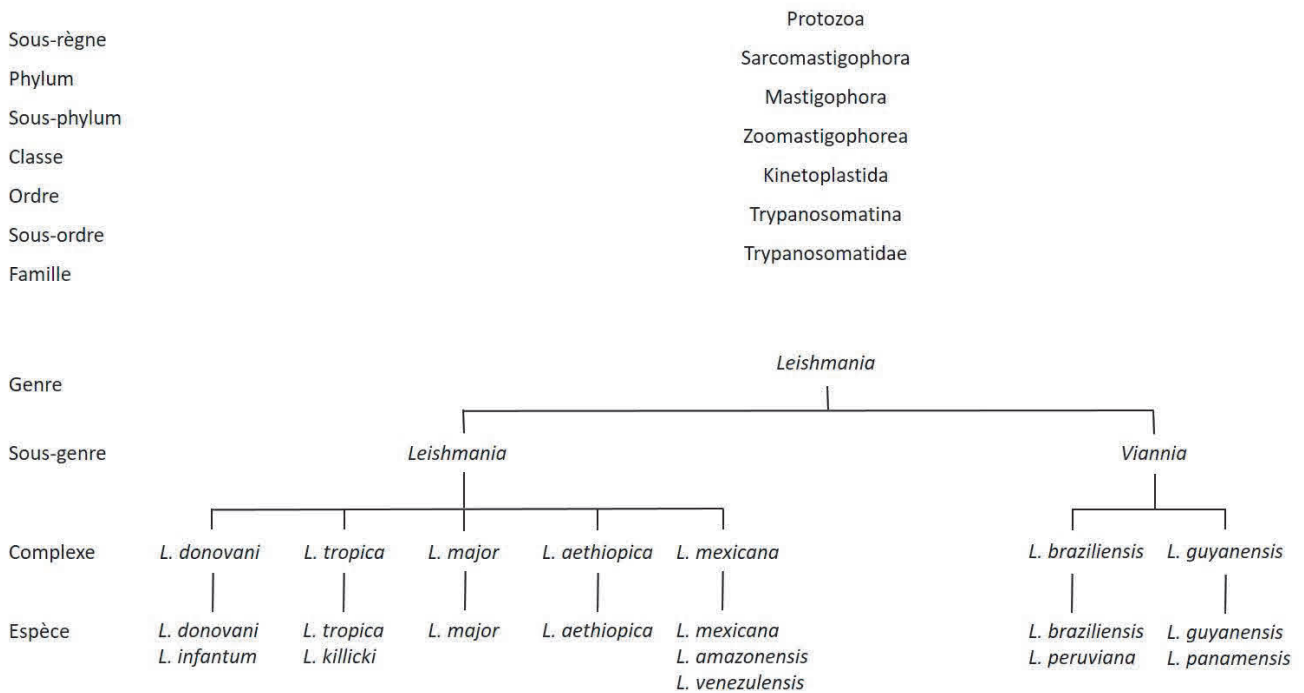
## II. Taxonomie

Les parasites *Leishmania* appartiennent au règne Protista (Haeckel, 1866), de la classe des *Kinetoplastea* (Honigberg, 196 ; Vickerman, 1976), de la sous-classe des *Metakinetoplastina* (Vickerman, 2004), de l'ordre des *Trypanosomatida* (Kent, 1880), de la famille des *Trypanosomatidae* (Döflein, 1901), de la sous-famille des *Leishmaniinae* (Maslov et Lukeš 2012) et du genre *Leishmania* (Ross, 1903).

Les premières tentatives de classification de *Leishmania* furent des classifications linnéennes nomothétiques proposées entre 1916 et 1961, sur des caractères extrinsèques uniquement. En 1908, une première classification de *Leishmania* a été suggérée par Nicolle : elle séparait *L. infantum*, l'agent de la leishmaniose viscérale méditerranéenne, de *L. donovani*, l'agent causal du kala azar indien. Quelques années plus tard, en 1964, Adler a mis en évidence la difficulté d'accepter une taxonomie basée sur des données cliniques. En effet ; la leishmaniose peut présenter des signes cliniques identiques pour différentes espèces (Adler, 1964). D'autres tentatives pour classer les *Leishmania* ont été présentées par Lainson et Shaw en 1987 : les deux sous-genres *Leishmania* et *Vianna* sont distingués selon la localisation géographique et le développement du parasite dans l'intestin du vecteur.

Dans les années 1970, afin de développer de nouveaux systèmes de classification, les caractéristiques intrinsèques à savoir immunologiques, biochimiques et moléculaires de *Leishmania* ont été identifiées et utilisées. L'électrophorèse des isoenzymes a été largement utilisée comme système de typage et a permis de séparer les espèces au sein de sous-genres (Rioux et al., 1990). Vickerman, quant à lui, a proposé en 1976, la reconnaissance de quatre complexes d'espèces au sein du même genre : le complexe *donovani*, *tropica*, *mexicana* et *braziliensis*.

Parmi les différentes classifications admises, c'est celle donnée par l'OMS qui est retenue.



**Figure 1.** Classification du genre *Leishmania* (d'après OMS).

De nombreuses questions subsistent quant aux espèces de *Leishmania* et aux symptômes qui leur sont associés. Pourquoi certaines espèces provoquent des formes cutanées alors que d'autres espèces mortelles pour l'homme et les animaux provoquent des symptômes viscéraux.

*Leishmania infantum* est une espèce à la fois dermatrope et viscérotrope c'est-à-dire qu'elle est impliquée dans les leishmanioses cutanée et viscérale. L'analyse des isoenzymes des souches de *L. infantum* démontre que le zymodème MON-24 est le plus fréquemment isolé des lésions cutanées, alors que le zymodème MON-1 et le zymodème MON-80 sont moins fréquemment identifiés dans les cas de leishmaniose cutanée (Aoun and Bouratbine, 2014).

### III. La répartition géographique

Les leishmanioses affectent 4 continents : l'Amérique, l'Asie, l'Europe et l'Afrique dans les zones tropicales et subtropicales de 88 pays, dont 72 sont des pays en développement.

On distingue alors deux zones géographiques : l'Ancien Monde (le sud de l'Europe, l'Afrique, l'Asie et le Moyen-Orient) et le Nouveau Monde (l'Amérique du Nord, du Sud et Centrale).

Les diverses manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes, mais ne sont pas propagées par la même espèce de *Leishmania* ni par la même espèce de phlébotomes dans les différentes régions.

### **1. Les leishmanioses viscérales**

La leishmaniose viscérale est présente dans 69 pays répartis sur tous les continents exceptée l'Océanie. *L. donovani* est retrouvé dans le sous-continent Indien et en Afrique de l'Est tandis que *L. infantum* est localisé sur le pourtour Méditerranéen, en Amérique du Sud, en Asie centrale et en Chine. L'incidence mondiale est estimée à 500 000 cas par an entraînant 50 000 décès annuels. Ces chiffres sont une approximation, puisque la déclaration des cas n'est obligatoire que dans la moitié des pays concernés, de plus certains cas sont asymptomatiques (Faucher and Piarroux, 2011).

Selon l'OMS, en 2017, 94% des nouveaux cas de leishmaniose viscérale ont été recensés dans six pays : le Brésil, l'Éthiopie, l'Inde, le Kenya, la Somalie et le Soudan, tandis que la majorité des cas de leishmanioses cutanées se produisent en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, en Colombie, en République islamique d'Iran, au Pakistan, au Pérou, en Arabie Saoudite et en République arabe syrienne (WHO, 2016).

Des épidémies dévastatrices ont été décrites en Afrique de l'Est et dans le sous-continent Indien. L'incidence mondiale de la leishmaniose viscérale a diminué au cours de dernières décennies : entre 200 000 et 400 000 nouveaux cas en 2012 contre 50 000 à 90 000 cas en 2017 (WHO, 2016). L'Inde, le Népal et le Bangladesh représentaient à eux seuls 50% de la charge mondiale des cas de leishmaniose viscérale. Depuis 2005, ces pays se sont engagés à éliminer la maladie ; l'objectif était d'éliminer au moins un cas pour 10 000 personnes par an. Ces efforts ont contribué au déclin global de la maladie. En Afrique de l'Est, les cas de leishmanioses viscérales restent stables. Les flambées précédentes étaient dues à la migration forcée des populations non immunisées vers des zones endémiques à la suite d'un conflit.

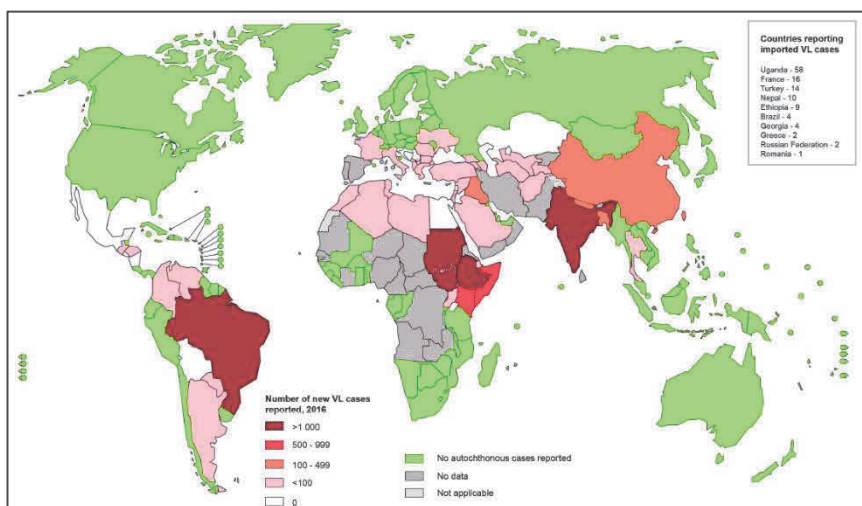


Figure 2. Distribution de la leishmaniose viscérale dans le monde (WHO, 2016).

## 2. Les leishmanioses cutanées

La leishmaniose cutanée est endémique dans plus de 70 pays à travers le monde et 90% des cas surviennent en Afghanistan, en Algérie, au Brésil, au Pakistan, au Pérou, en Arabie Saoudite et en Syrie (Reithinger et al., 2007). Environ 350 millions de personnes seraient à risque avec une prévalence mondiale de 12 millions et une incidence de 1,5 millions de cas. En raison du réchauffement climatique et des changements dans l'écologie humaine ces chiffres devraient augmenter.

La leishmaniose cutanéomuqueuse est américaine : plus de 90% des cas surviennent au Brésil, en Bolivie et au Pérou.

Le nombre de cas de leishmaniose cutanée a considérablement augmenté ces dernières années notamment à cause de la migration forcée. Dans l'Ancien Monde, les espèces telles que *L. major*, *L. tropica*, et *L. aethiopica* sont répandues autour du bassin Méditerranéen, du Moyen-Orient ou du sous-continent Indien.

Les espèces du Nouveau Monde telles que *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* et *L. guyanensis* sont endémiques en Amérique Centrale et en Amérique du Sud. En Amérique, l'épidémiologie de la maladie est complexe, particulièrement avec les différences espèces de *Leishmania* en circulation dans la même zone géographique, plusieurs hôtes réservoirs et des manifestations cliniques variables (Burza et al., 2018).

Plusieurs espèces de *Leishmania* à tropisme cutané et muco-cutané, montrent la présence d'un virus persistant, monoségrégué, à ARN double brin (DSRNA) nommé Leishmanivirus (LRV), membre de la famille des Totiviridae. LRV1 est le plus souvent observé chez les espèces du nouveau monde, *Leishmania (Viannia) L. braziliensis* et *L. guyanensis*, et le LRV1 chez des espèces de l'ancien monde avec *L. major* (Ronet et al., 2011; Scheffter et al., 1995)

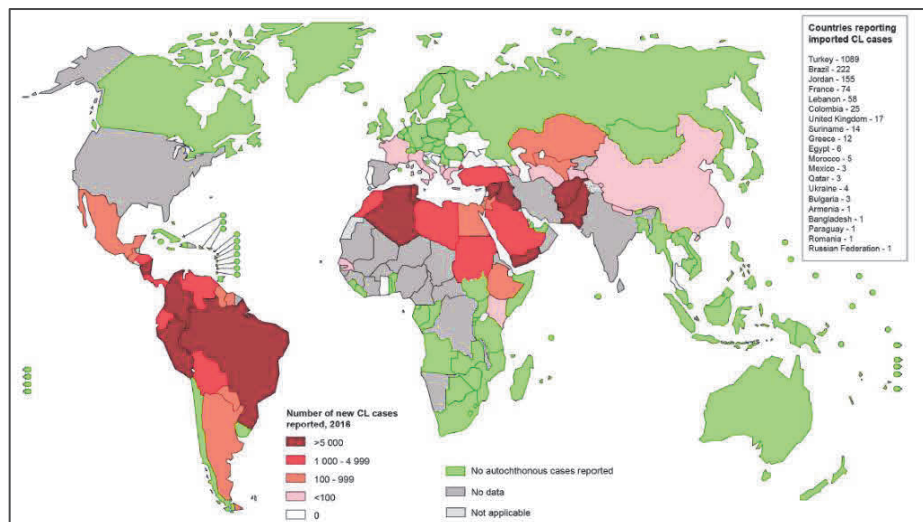


Figure 3. Distribution de la leishmaniose cutanée dans le monde (WHO, 2016).

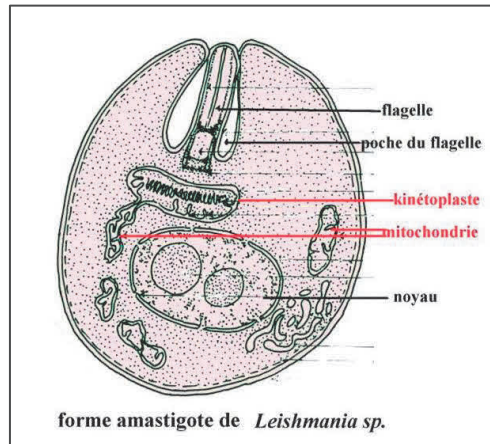
#### IV. Biologie des leishmanies

##### 1. L'organisation cellulaire

Comme tous les protozoaires, les trypanosomatidés sont des êtres vivants unicellulaires autonomes. *Leishmania* est une cellule ovoïde avec un flagelle dépassant de la poche flagellaire à l'avant (Flegontov et al., 2013). Celle-ci est au cœur de la morphogénèse des trypanosomes et est associée à de nombreux organites à copie unique tel que le couple corps basal / corps pro-basal, le flagelle, l'appareil de Golgi et l'ADN mitochondrial autrement appelé le kinétoplaste (Lacomble et al., 2010). La poche est le site de toutes les endocytoses et exocytoses jouant un rôle critique dans la pathogénicité du parasite (Field and Carrington, 2009). Une formation correcte des poches est vitale pour la morphogénèse, la viabilité et l'infectivité des cellules (Wheeler et al., 2016) (Figure 4). L'architecture cellulaire de *Leishmania* est conservée entre les deux formes du parasite.

*Leishmania* est un parasite avec un cycle de vie dimorphique impliquant un hôte mammifère et un insecte vecteur. Il a deux morphologies cellulaires différentes : une forme promastigote chez le vecteur, la mouche des sables et une forme amastigote chez l'hôte mammifère.



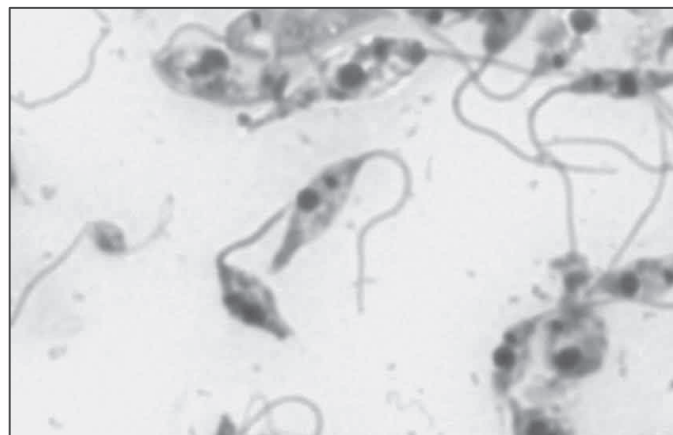


**Figure 4.** Représentation schématique de l'organisation cellulaire de *Leishmania* (d'après T.Duriez)

## 2. Les différentes formes du parasite

### a. La forme promastigote

Les promastigotes sont des formes extracellulaires, munis d'un flagelle, de forme allongée vivant dans le tube digestif du phlébotome. Ce sont des cellules plus ou moins fuselées de 5 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur et de 1 à 4  $\mu\text{m}$  de largeur, prolongées par un flagelle pouvant atteindre 20  $\mu\text{m}$  de longueur au niveau du pôle antérieur. Le noyau est central et le kinétoplaste est localisé en position antérieure (Figure 5).



**Figure 5.** Forme promastigote du parasite *Leishmania* (laboratoire de parasitologie, LAGEPP)

### b. La forme amastigote

Les amastigotes sont des formes intracellulaires, ovoïdes ou sphériques, de 2 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, immobiles et localisés chez l'hôte vertébré au niveau des phagolysosomes des macrophages. Le noyau est central, proche du kinétoplaste. Ces amastigotes se multiplient par division binaire.

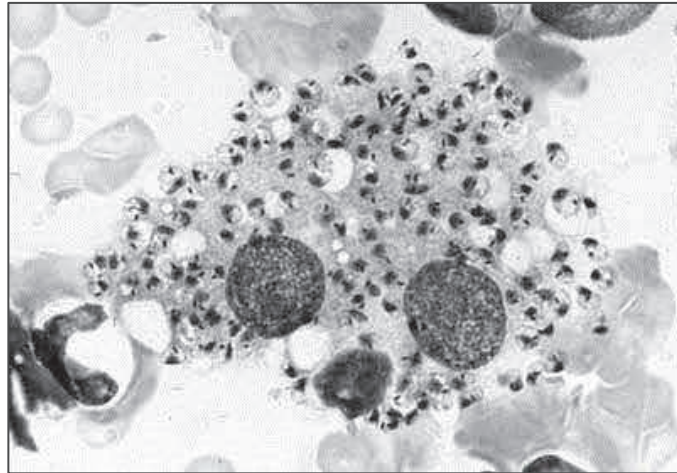


Figure 6. Forme amastigote de *Leishmania* (LeishVet).

### V. Le vecteur

Le phlébotome femelle est le seul vecteur de la leishmaniose. Autrement appelé « mouches des sables », il appartient à l'ordre des Diptères, au sous-ordre des Nématocères, à la famille des *Psychodidae* et à la sous-famille des *Phlébotominae* (Akhoundi et al., 2016). Dans l'Ancien monde celui-ci appartient au genre *Phlebotomus* (figure 7) et dans le Nouveau monde, au genre *Lutzomyia* (figure 7). Cent vingt des quelque 800 espèces connues de phlébotomes répandent la leishmaniose.



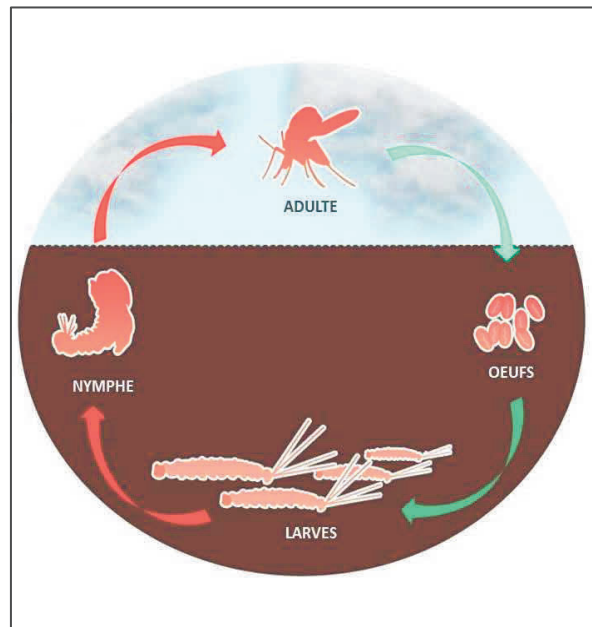
Figure 7. Phlébotome *Phlebotomus* (à gauche) et Phlébotome *Lutzomyia* (à droite).

## 1. Morphologie

Le phlébotome hématophage est un arthropode présentant un corps allongé et mesurant de 2 à 3 mm de longueur, poilu et volant sans bruit. Le corps et les petites ailes sont très velus et au repos, les insectes tiennent leurs ailes en position verticale en forme de V au-dessus d'eux.

## 2. Le cycle de vie

Le cycle de vie du phlébotome est holométabole qui comprend obligatoirement l'œuf, quatre stades larvaires, une nymphe ainsi que l'imago. Afin de se procurer les éléments nutritifs nécessaires pour son ovogenèse, la femelle prend un repas sanguin. Le temps de latence entre un repas sanguin et la maturation des œufs est variable de la vitesse de digestion et de la température ambiante.



**Figure 8.** Schéma représentatif du cycle de vie du phlébotome (fleatickrisk.com).

Les femelles gravides déposent leurs œufs (80 à 100 œufs) dans des biotopes qui garantissent des conditions optimales : dans les terriers de certains rongeurs, dans l'écorce des vieux arbres, dans les bâtiments en ruine, dans les fissures des murs des maisons, dans les abris pour animaux et dans les ordures ménagères, ou dans des environnements où les larves peuvent trouver la matière organique, la chaleur et l'humidité nécessaires à leur développement.

Les œufs se développent en larves dans les sols alluviaux ou alcalins, dans les terriers ou dans des tas de débris végétaux. Les larves ne peuvent pas survivre au dessèchement, elles se nourrissent de déchets organiques puis se nymphosent. Ensuite, la nymphe entrera dans un état de vie ralentie et subira la mue imaginale conduisant à l'adulte.

### **3. Habitat**

Les espèces de phlébotomes selon qu'elles soient dans l'Ancien Monde ou le Nouveau monde vivent dans des écosystèmes différents. En effet, dans l'Ancien Monde, les phlébotomes vivent dans des écosystèmes désertiques ou semi-arides et les espèces du Nouveau Monde dans des habitations forestières. Dans l'Ancien Monde, certaines espèces se reproduisent dans des situations péri-domestiques et pénètrent dans des habitations humaines, tandis que la transmission des maladies est associée aux humains vivants ou travaillant près de la forêt, dans le Nouveau Monde (Sharma and Singh, 2008).

### **4. Comportement des phlébotomes**

Les phlébotomes se rencontrent dans les régions intertropicales et tempérées du monde. On en retrouve également en Europe et notamment en France. Ils se trouvent autour des habitations humaines et se reproduisent dans des déchets organiques spécifiques tels que les excréments, le fumier, la litière de feuilles et dans les coins sombres des crevasses des murs ayant une humidité et une température élevées, bien qu'ils puissent être observés dans des conditions sèches avec un microclimat local favorable. Leur activité est majoritairement nocturne et crépusculaire, ils sont actifs en soirée si la température est suffisamment élevée (19-20°C) en l'absence de vent et si le degré d'hygrométrie est élevé. La journée, ils se cachent dans des endroits abrités, sombres et humides. Les phlébotomes se déplacent par vols courts avec de fréquents arrêts. Leur rayonnement maximum se situe à 1 km. Actifs tout au long de l'année en région tropicale, ils disparaissent pendant l'hiver dans les régions tempérées. C'est alors que la pérennité de l'espèce est assurée par les larves hibernantes. Leur apparition, leur densité, leur période d'activité et leur disparition sont variables selon différents paramètres tels que l'altitude, la latitude, la saison et l'espèce (Sharma and Singh, 2008).

## VI. Les réservoirs

Les réservoirs des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages tels que les carnivores, les rongeurs, les marsupiaux, les primates et dans certains cas l'Homme.

Seules deux espèces de *Leishmania* sont anthroponotiques, il s'agit de *L. donovani* et *L. tropica* tandis que les autres sont zoonotiques. La transmission, pour la forme anthroponotique se fait d'une personne à l'autre par l'intermédiaire du phlébotome où l'Homme est la seule source d'infection pour le vecteur. *L. donovani* est présente en Inde, au Bangladesh, en Éthiopie, au Soudan et au Sud du Soudan. Tandis que pour la leishmaniose cutanée due à *L. tropica*, la localisation est dans l'Est Méditerranéen, dans le Nord et le Sud de l'Afrique.

En Amérique du Sud, les réservoirs animaux sont impliqués dans la transmission de la leishmaniose cutanée, notamment les rongeurs dans le cas de *L. mexicana*, les opossums et les rongeurs pour *L. amazonensis*, les rongeurs et les chevaux pour *L. braziliensis* et les opossums, paresseux et fourmiliers pour *L. guyanensis*.

Pour la forme zoonotique localisée dans le bassin méditerranéen, l'Asie et le Brésil, il existe deux réservoirs : le chien pour *L. infantum* et les rongeurs pour *L. major*. Les renards et les loups peuvent aussi être les réservoirs de *L. infantum* (Bray, 1974).

En Afrique de l'Est les réservoirs sont les damans et transmettent *L. aethiopica*. (Burza et al., 2018).

**Tableau 1.** Caractéristiques des formes cliniques, des principaux réservoirs et de la localisation des différentes espèces de *Leishmania*.

	Formes cliniques	Principaux réservoirs	Localisations
<i>L. donovani</i>	LV PKDL	Humain	Inde Bangladesh Éthiopie Soudan et Sud du Soudan
<i>L. tropica</i>	LC	Humain	Est Méditerranéen Nord et Sud de l’Afrique
<i>L. aethiopica</i>	LC	Hyracoïdes	Éthiopie Kenya
<i>L. major</i>	LC	Rongeurs	Iran Arabie Saoudite Nord de l’Afrique Asie centrale Afrique de l’Ouest
<i>L. infantum</i>	LV	Chiens Lièvres	Chine Sud de l’Europe Brésil Amérique du Sud
<i>L. mexicana</i>	LC	Rongeurs Marsupiaux	Amérique du Sud
<i>L. amazonensis</i>	LC	Opossums Rongeurs	Amérique du Sud
<i>L. braziliensis</i>	LC	Chiens Rongeurs Chevaux	Amérique du Sud
<i>L. guyanensis</i>	LC	Opossums Paresseux Fourmiliers	Amérique du Sud

## **VII. Les formes cliniques**

### **1. La leishmaniose viscérale**

La leishmaniose viscérale ou Kala Azar dans le sous-continent Indien, est la forme la plus grave. Son évolution est fatale en l'absence de traitement. Elle compte parmi les maladies tropicales négligées à plus fort taux de mortalité. Dans le sous-continent Indien, l'hyperpigmentation de la peau est probablement le résultat de l'augmentation de l'hormone adrénocorticotrope induite par les cytokines. C'est de là que provient le nom hindi Kala Azar signifiant la fièvre noire (Burza et al., 2018).

L'apparition de la leishmaniose viscérale peut être aiguë ou insidieuse et la période d'incubation oscille entre 2 semaines et 8 mois au bout desquels les patients présentent des symptômes et des pathologies persistantes. Les symptômes cliniques sont une fièvre irrégulière persistante et une splénomégalie viscérale. D'autres symptômes comme la pancytopenie, l'hépatomégalie, l'hypergammaglobulinémie et la perte de poids sont courantes chez les patients se présentant tardivement. Le bilan biologique démontre une perturbation de la numération de la formulation sanguine avec une anémie, une leucopénie et une thrombopénie parfois associées à une pancytopenie plus ou moins profonde, une hypergammaglobulinémie polyclonale associée à une hypoalbuminémie et un syndrome inflammatoire sévère avec accélération importante de la vitesse de sédimentation (Reithinger et al., 2007).

La leishmaniose viscérale, dans le cas de patients immunodéprimés, est d'autant plus grave que l'efficacité du traitement est limitée et les rechutes nombreuses.

Les manifestations cliniques de la leishmaniose viscérale sont similaires dans les différentes zones d'endémie, cependant il existe quelques différences. Par exemple, les ganglions lymphatiques hypertrophiés sont rarement trouvés chez les patients indiens tandis qu'ils sont fréquents chez les patients soudanais. L'hyperpigmentation n'a été décrite que chez des patients du sous-continent indien, mais aujourd'hui, ce symptôme est rare et était peut-être une caractéristique d'une maladie prolongée à l'époque où aucun traitement efficace n'était disponible.

Au fur et à mesure que la maladie progresse, la splénomégalie peut augmenter et provoquer une distension abdominale ainsi que des douleurs, qui sont parfois augmentées par une hépatomégalie concomitante (Chappuis et al., 2007).

La leishmaniose viscérale est causée par deux espèces. D'une part, *L. donovani*, anthroponotique, hautement endémique en Afrique de l'Est et dans le sous-continent indien, elle touche toutes les tranches d'âge. D'autre part, *L. infantum*, zoonotique à réservoir canin, localisée dans les pays du pourtour méditerranéen, le Moyen-Orient et l'Amérique du Sud est pathogène chez l'enfant et les immunodéprimés (atteint du VIH) (Alvar et al., 2012).



**Figure 9.** Manifestations cliniques de la leishmaniose viscérale chez des enfants (Chappuis et al., 2007).

## 2. Les leishmanioses tégumentaires

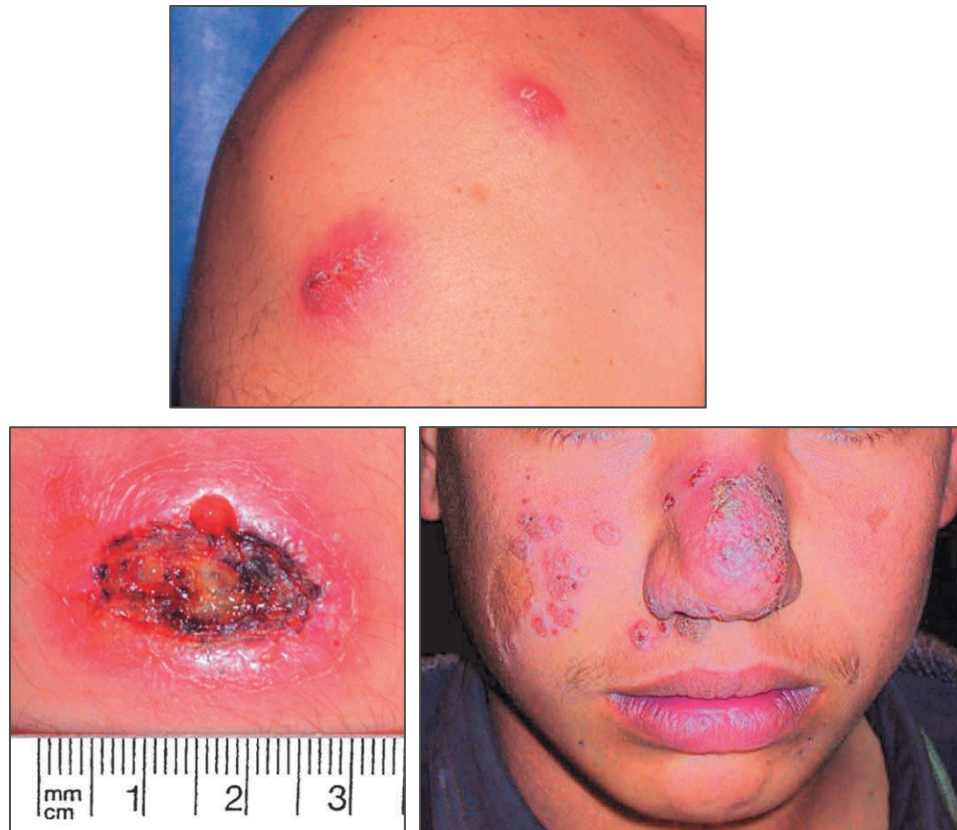
Les leishmanioses tégumentaires regroupent d'une part la leishmaniose cutanée et d'autre part la leishmaniose cutanéomuqueuse.

La leishmaniose cutanée est la forme de la maladie la moins grave. Elle est causée par différentes espèces telles que : *L. major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* et *L. braziliensis* dans différentes régions du centre et de l'Amérique du Sud (Goto and Lauletta Lindoso, 2012). Elle se présente sous forme de petites papules qui grossissent et s'ulcèrent en leur centre afin de produire une lésion en forme de volcan. Les lésions ulcéreuses sont typiques d'une infection à *L. major* et aux espèces du Nouveau Monde. Alternativement, la lésion peut rester comme un nodule lisse ou la surface peut devenir hyperkératosique notamment dans les régions de l'Ancien Monde.



Les lésions nodulaires sont associées aux infections par *L. aethiopica* ou *L. donovani*, tandis que les lésions hyperkératosiques sont associées à *L. tropica*. Les lésions peuvent devenir importantes en taille cependant elles ne dépassent pas les 10 cm de diamètre.

L'ulcération ne pénètre que rarement dans les tissus sous-cutanés à l'exception du cartilage dans le pavillon de l'oreille. Ces lésions sont indolores à moins qu'une infection secondaire ne se déclare.



**Figure 10.** Manifestations cliniques de la leishmaniose cutanée. (A) Petites papules rouges dues à *L. infantum* à Majorque. (B) Nodule hyperkératosique dû à *L. tropica* en Afghanistan. (C) Ulcération due à *L. major* en Afghanistan (Bailey and Lockwood, 2007).

Quelques semaines après la piqûre du phlébotome, les lésions apparaissent au niveau des zones exposées, particulièrement sur les parties non couvertes du corps, les jambes, les bras ou le visage. Les lésions causées par *L. tropica* et *L. major* sont auto-cicatrisantes en un an. Elles ont cependant tendance à laisser des cicatrices permanentes. Les lésions causées par *L. aethiopica* mettent plusieurs années à guérir et peuvent évoluer vers la leishmaniose cutanéomuqueuse et des formes diffuses de celle-ci (Thomaidou et al., 2015).

La leishmaniose cutanée ne met pas la vie des malades en danger, mais peut entraîner une morbidité esthétique et une stigmatisation sociale et des effets psychologiques.

Deux autres formes de la leishmaniose tégumentaire existent : il s'agit de la leishmaniose cutanée diffuse et de la leishmaniose cutanéomuqueuse.

La leishmaniose cutanée diffuse est une forme beaucoup plus rare. Elle se caractérise par une infiltration diffuse de la peau sous forme de papules, macules, voire des plaques disséminées ou des lésions nodulaires. L'atteinte est majoritairement au niveau du visage et des membres. Les ulcérations sont très rares et l'atteinte des muqueuses se restreint aux bordures des narines et des lèvres. Liée à une immunodépression, elle est plus difficile à traiter. De plus, c'est une forme qui ne guérit pas spontanément et il existe une forte tendance aux rechutes après le traitement. Dans le Nouveau Monde, elle est causée par *L. aethiopica* tandis que dans l'Ancien Monde, elle est causée par *L. mexicana* et *L. amazonensis*.

La leishmaniose cutanéomuqueuse ou « espundia » se manifeste de quelques jours à plusieurs années après la leishmaniose cutanée. Les atteintes concernent généralement la partie postérieure du septum nasale où les lésions sont nodulaires avant d'évoluer vers des ulcères donnant lieu à des sécrétions nocturnes sanguinolentes. À un stade avancé, les atteintes sont plus importantes : il peut y avoir notamment une perforation du septum nasal, une ulcération palatine ou un œdème gingival. Dans d'extrême cas, on observe une destruction des muqueuses du nez, de la bouche et de la gorge. Elle présente un potentiel élevé de séquelles destructrices défigurantes et invalidantes. L'Amérique du Sud représente la zone endémique la plus importante. Elle est causée par *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* et *L. guyanensis* (Strazzulla et al., 2013). Les virus à ARN de *Leishmania* (LRV) augmentent la probabilité de développer la leishmaniose cutanéomuqueuse (Scheffter et al., 1995).



**Figure 11.** Représentation clinique de la leishmaniose cutanéomuqueuse (santépublique.fr).

La leishmaniose post-kala-azar (PKDL) est une complication dermatologique non mortelle qui survient chez certains patients atteints de LV. Elle peut être confondue avec la lèpre et se développe après six mois et parfois après 5 ans après la LV (Das, 2020). Elle se manifeste généralement par une combinaison variable de plaque hypopigmentées, de plaques de papules succulentes érythémateuses et de lésions nodulaires sur le visage et le haut du corps (Kumar et al., 2021).

## VIII. Le cycle de vie

Le cycle de vie de *Leishmania* est dimorphique c'est-à-dire qu'il nécessite deux hôtes : l'insecte phlébotome ainsi que le mammifère. Au cours du cycle le parasite se retrouve sous deux formes distinctes : la forme promastigote, évoluant dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré. Dans les deux cas, ils se multiplient par division binaire.

Lorsque la femelle phlébotome prend un repas sanguin chez l'hôte mammifère (1), elle inocule le parasite sous la forme promastigote infectante. Le parasite va ensuite infecter un phagocyte notamment les neutrophiles qui jouent un rôle central dans la pathogenèse de *Leishmania* en fonctionnant comme "chevaux de Troie" avant d'entrer dans leurs cellules cibles les macrophages du système réticulo-endothélial (2) et se transformer en forme amastigote (3).

S'ensuit une multiplication du parasite par fission binaire dans le phagolysosome du phagocyte (4). Lorsque le nombre de parasites est trop important, le macrophage éclate et libère les amastigotes qui sont phagocytés par les cellules avoisinantes où le processus se poursuit. Le cycle s'achève lorsque le phlébotome femelle prend son repas sanguin au niveau du site d'infection et aspire des phagocytes contenant le parasite (5-6). Une fois les amastigotes libérés dans le tube digestif du vecteur ceux-ci vont se transformer en promastigotes (7). Dans un premier temps, les parasites sont sous forme de promastigotes procycliques et se divisent activement. Au bout de quatre jours, les parasites deviennent plus allongés et mobiles, ils s'accrochent alors aux microvillosités des cellules épithéliales de l'intestin médian par leur flagelle. Puis, les parasites migrent vers la partie antérieure de l'intestin médian jusqu'à la valve du stomodaeum où ils se transforment en promastigotes métacycliques, au bout du septième jour (8). A ce stade ils ne se divisent plus, leur forme est allongée et hautement mobile grâce à leur long flagelle. La forme promastigote métacyclique est la forme la plus infectieuse du parasite.

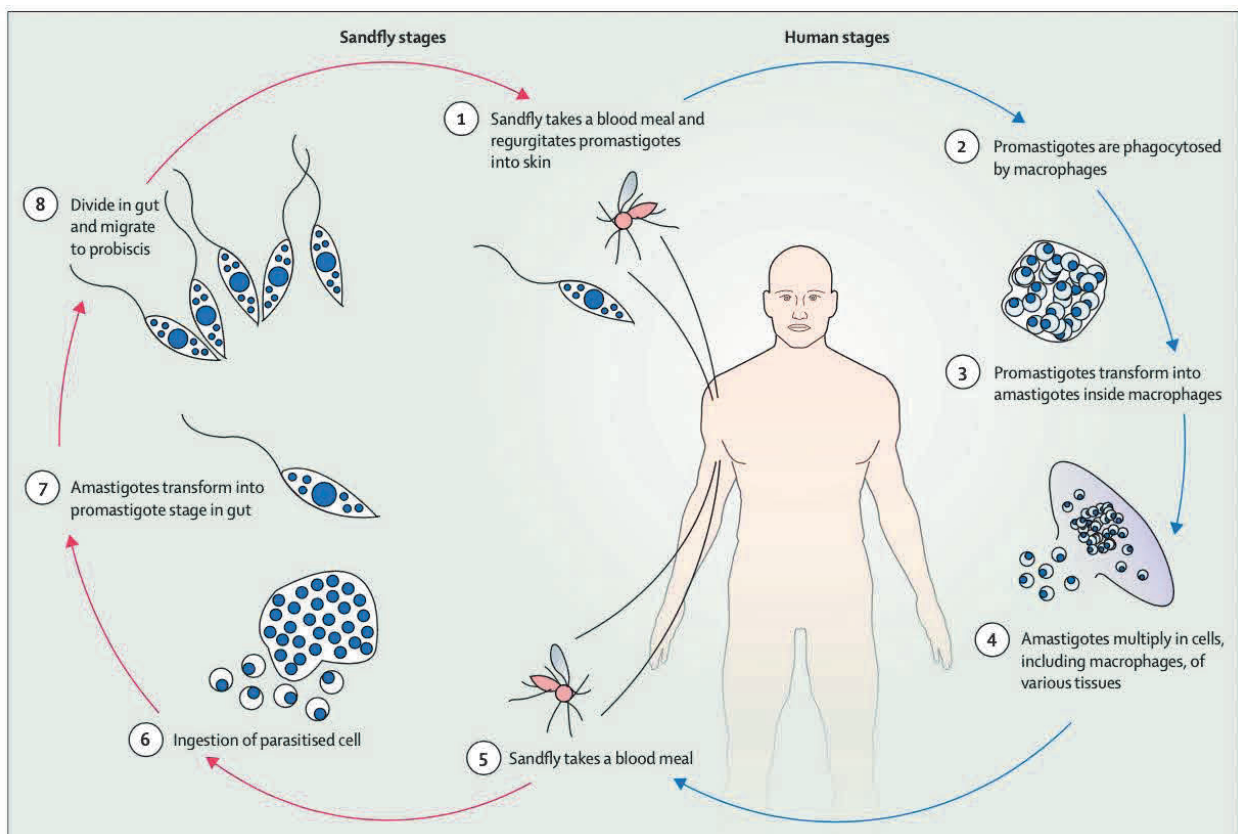


Figure 12. Cycle de vie de *Leishmania* (Burza et al., 2018).

## **IX. La métacyclogenèse**

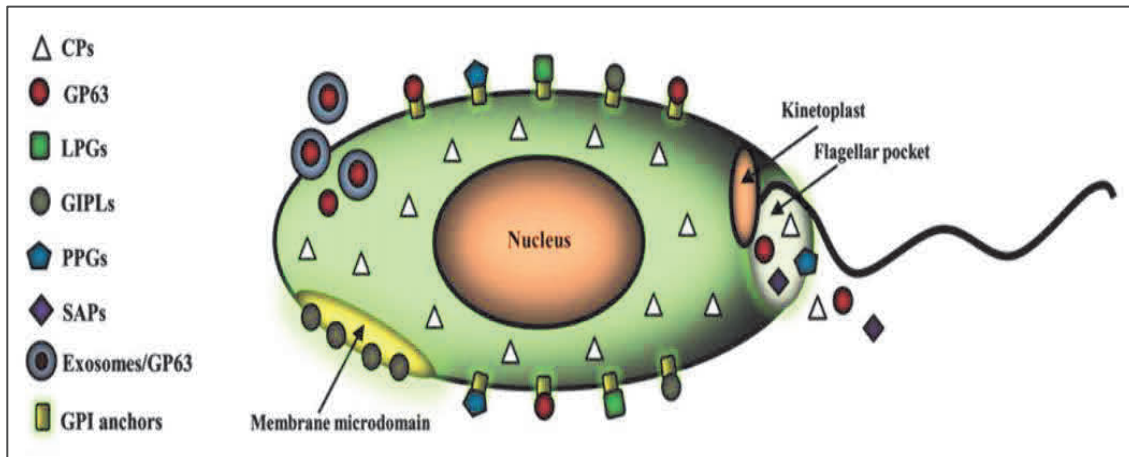
La métacyclogenèse est le processus par lequel le parasite se différencie de la forme promastigote procyclique en la forme promastigote métacyclique. Cette transformation s'accompagne d'une capacité augmentée à infecter et à survivre chez l'hôte vertébré. La métacyclogenèse se produit dans l'insecte vecteur dans la nature mais peut aussi se produire dans des cultures axéniques de promastigotes. Cette transformation s'accompagne de changement dans la morphologie notamment la taille, la forme, la longueur du flagelle, dans l'expression des molécules de surfaces telles que le LPG et gp63. Certains gènes sont étroitement liés à la métacyclogenèse tel que le gène B et Mat-1. Trois protéines : Meta-1, SHERP et HASP ont été régulées à la hausse au cours du stade métacyclique.

## **X. La transformation promastigote-amastigote**

La différenciation promastigote-amastigote est une transformation morphologique et physiologique du parasite. Le parasite perd alors son flagelle, change sa couche de glycoconjugués et exprime un ensemble d'enzymes métaboliques actives. Les différentes étapes de transformation de la forme promastigote en forme amastigote permettent la survie du parasite au sein de la vacuole parasitophore. La température et un pH acide dans le phagolysosome permettent cette différenciation. Des changements cruciaux au niveau des molécules de surfaces sont aussi observées permettant la pathogénicité et la survie des parasites. Cette transformation peut aussi se produire dans des cultures axéniques.

### **1. Le LPG : lipophosphoglycane**

Il est exprimé à la surface du parasite sous forme promastigote, y compris sur le flagelle. Il forme un glycocalyx dense sur toute la surface, y compris le flagelle (Handman and Bullen, 2002).



**Figure 13.** Représentation schématique d'un promastigote avec les différentes molécules de surfaces ancrées au GPI : gp63, LPG, PPG, GIPL (Olivier et al., 2012).

Le LPG est une grosse molécule contenant un squelette lipidique recouvert d'unités disaccharide-phosphate répétitives attachées à un noyau glycane qui est inséré dans la membrane via une ancre inositol (GPI). La molécule est coiffée d'une petite structure oligosaccharidique qui varie selon les espèces (Olivier et al., 2012).

Après une infection, le parasite sous forme métacyclique doit résister à l'action du complément, s'attacher et pénétrer dans les macrophages, résister aux défenses de l'hôte telles que les oxydants et les enzymes hydrolytiques, inhiber l'activation des macrophages et se différencier au stade amastigote, stade adapté pour la survie à long terme et la réplication au sein d'un phagolysosome acidifié. Dans de nombreuses étapes nécessaires à l'établissement des infections aux macrophages et à la survie de l'insecte vecteur, le LPG a été impliqué. Celui-ci ne joue cependant pas de rôle au stade amastigote, car ce stade parasite ne synthétise pas de LPG. Les amastigotes produisent quant à eux des glycoconjugués structurellement apparentés (Späth et al., 2003).

Le LPG joue un rôle important dans l'interaction du parasite avec l'hôte. Il a été démontré que le LPG inhibe l'activation de la protéine kinase C, une protéine de signalisation des macrophages et aide donc à l'entrée du parasite (Vinet et al., 2009). Cette famille de protéine joue un rôle clé dans la régulation des macrophages, en activant des cytokines telle que l'IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  et dans la conduite de plusieurs fonctions du macrophage comme la production de l'oxyde d'azote et l'éclatement oxydatif. Des molécules des promastigotes tels que les LPG sont capables de bloquer l'activité de la PKC. Cette inhibition est due à la liaison du LPG au domaine régulateur de PKC qui contient les sites de liaison DAG, calcium et phospholipides.

Les amastigotes sont également capable d'inhiber la PKC, malgré leur manque de GPL suggérant que d'autres facteurs peuvent médier à cet effet inhibiteur (Shio et al., 2012). Le LPG peut notamment permettre aux promastigotes d'inhiber la maturation des phagosomes au stade précoce de l'infection. Cette stratégie permet aux promastigotes de survivre à l'intérieur de la vacuole parasitophore jusqu'à leur transformation en amastigote (Olivier et al., 2012).

Le développement de mutants de *Leishmania* déficients en LPG au cours des dernières années a permis d'analyser les fonctions de ces structures. Une étude a démontré que le LPG est impliqué dans la protection des promastigotes de *L. donovani* contre les enzymes digestives. En effet, les mutants LPG2, déficients en LPG et autres phosphoglycanes, n'ont pas survécu à l'environnement hydrolytique de l'intestin moyen des insectes et ont été incapables d'établir l'infection dans les macrophages (Jesus-Santos et al., 2020)

## **2. Les glycosylphosphatidylinositol (GPI)**

Les phosphatidylinositols glycosylés sont aussi des molécules de surface abondantes chez *Leishmania*. La forme promastigote synthétise des niveaux élevés de GPI libres qui sont dix fois plus abondants que le LPG (McConville et al., 2002).

La surface des amastigotes est revêtue d'une couche superficielle de GPI libres et de glycosphingolipides dérivés de l'hôte, acquis le plus probablement à partir de la feuille interne de la membrane du phagolysosome des macrophages (Schneider et al., 1993; Winter et al., 1994).

Chez *L. amazonensis*, des GPI spécifiques aux amastigotes AmGPI-Y et AmGPI-Z, ont été identifiés, ce sont deux glycolipides contenant de l'éthanolamine (EtN). Les EtN-GPI sont essentiels pour la viabilité, la réplication et/ou la virulence de l'amastigote. Dans cette étude, il a été démontré que la souche génétiquement modifiée était déficiente en EtN-GPI. Les amastigotes de cette souche étaient plus sensibles, leurs croissances étaient inhibées et la virulence des parasites étaient réduite (Mensa-Wilmot et al., 1999). Les GPI peuvent être essentiel pour la réplication des amastigotes. Ces GPI peuvent également protéger les transporteurs essentiels de la membrane plasmique contre la protéolyse dans le lysosome de la cellule hôte tandis que l'absence de protéines exposées à la surface pourrait constituer une forme d'évasion immunitaire (McConville et al., 2002).

L'importance du rôle des GPI dépend de la souche de *Leishmania*. Des mutants de *L. donovani* dépourvu de six des sept copies de gènes pour la protéine GPI sont plus sensibles à la lyse du complément. Toutefois, les mutants de *L. mexicana* dépourvus de toutes protéines GPI peuvent établir une infection chez les animaux (Hilley et al., 2000).

### **3. Les glycosylphosphatidylinositol phospholipides (GIPLs)**

La surface des promastigotes et amastigotes de *Leishmania* est aussi recouverte d'une abondante classe de phospholipides de glycosylinositol (GIPL).

L'abondance des GIPL dans la forme amastigote (McConville et al., 2002) et les capacités des ancrages GPI purifiés et des GIPL à moduler les voies de signalisation impliquées dans la survie des parasites dans les macrophages (Proudfoot et al., 1995) ont conduit à déterminer que ces molécules jouent un rôle majeur dans la virulence du parasite (Zufferey et al., 2003).

En effet, les GIPL désactivent la cascade de la protéine kinase C altérant la production de ROS (Chawla and Vishwakarma, 2003).

L'équipe de Zufferey a démontré qu'à la suite d'une perte complète des GIPL, une légère diminution du taux de croissance des promastigotes *in vitro* est observée ainsi qu'un faible taux de croissance des amastigotes dans des macrophages *in vivo* (Zufferey et al., 2003). Les GIPL sont des molécules clés pour la survie des amastigotes mais ils ne sont pas nécessaires de façon unique pour cette croissance et survie dans les macrophages.

Les GIPL sont présent dans les microdomaines membranaires et leur perturbation entraine une diminution significative de l'infectivité des macrophages (Yoneyama et al., 2006). Une étude a démontré que la glycosylation des GIPL chez *L. major* semble important pour l'invasion des macrophages (Suzuki et al., 2002).

### **4. Les protéophosphoglycane (PPG)**

Les protéophosphoglycane sont un groupe de glycoconjugués contenant des phosphoglycane. Liés aux protéines, ils sont produits à la fois par la forme amastigote et la forme promastigote de plusieurs espèces de *Leishmania*. Ils peuvent être trouvés sous différentes formes allant des composants filamenteux (fPPG), sécrétés (sPPG), aux composants liés à la membrane (mPPG). Ces différentes formes jouent un rôle important notamment dans l'établissement de l'infection à *Leishmania*.



Dans une étude, les fPPG ont été décrits comme des glycoprotéines de type mucine, que l'on trouve dans le surnageant des cultures de *Leishmania* sous forme promastigote, dans le centre de la rosette des parasites en division active (Ilg, 2000).

#### **a. La glycoprotéine 63 (gp63)**

C'est une métalloprotéase ancrée au glycosylphosphatidylinositol exprimée principalement par les promastigotes et qui serait libérée du parasite via les exosomes. Elle est environ 10 fois moins abondante que le LPG mais comme lui, elle recouvre entièrement le parasite. La gp63 est abondante chez les promastigotes mais elle est régulée à la baisse chez les amastigotes. L'expression réduite de gp63 peut être compensée par l'absence de GPL sur la surface amastigote. En effet, la gp63 n'est plus enfouie dans une mer de GPL et peut donc jouer un rôle important dans la capacité des amastigotes à moduler l'hôte (Olivier et al., 2012)

Compte tenu de sa présence sur les deux formes du parasite, la gp63 est susceptible de jouer, selon le stade parasitaire, différents rôles. Notamment, chez les promastigotes de *L. amazonensis* et *L. major*, elle permet de cliver le C3b en iC3b et ainsi d'aider le parasite à éviter la lyse médiée par le complément. Parallèlement, la génération d'iC3b peut agir comme une opsonine aidant le parasite à interagir avec les macrophages via les récepteurs du complément 1 et 3 favorisant son internalisation (Mosser and Edelson, 1985).

La gp63 a également été signalée comme interagissant avec le récepteur de la fibronectine et pourrait donc aider davantage l'adhésion du parasite aux macrophages (Brittingham et al., 1999).

### **XI. La vacuole parasitophore (VP)**

Une fois phagocytés par les macrophages de l'hôte, les parasites s'établissent dans la vacuole parasitophore (VP) leur permettant de résister à la dégradation. La VP est un compartiment intracellulaire dérivé en partie de la voie endocytique de la cellule hôte.

La vacuole est un compartiment hybride jouant un rôle crucial afin d'établir et de maintenir l'infection, puisqu'elle existe à l'interface entre l'hôte et l'agent pathogène.

Des études ont démontré que les parasites du complexe *L. mexicana* résidaient dans de grandes vacuoles communes qui pouvaient occuper une grande partie du volume interne de la cellule hôte, tandis que d'autres espèces, comme *L. donovani* et *L. infantum*, résident et se séparent en vacuoles individuelles après la division du parasite (Castro et al., 2006). A la différence d'autres pathogènes intracellulaires, *Leishmania* doit faire face à divers défis notamment l'acquisition de nutriments, l'activation des cellules hôtes et l'apoptose des cellules hôtes pouvant compromettre sa survie.

### **1. Formation de la vacuole parasitophore**

Lorsque le phlébotome prend un repas sanguin, il inocule le parasite sous forme promastigote. Les neutrophiles et les macrophages sont rapidement recrutés au niveau du site de la piqûre. *Leishmania* interagit avec le macrophage via son flagelle et certains récepteurs des macrophages tels que les récepteurs du complément, du mannose, de Fcγ et de la fibronectine (Forestier et al., 2011; Ueno and Wilson, 2012). Le choix du récepteur va directement impacter l'évolution de l'infection (Veras et al., 2019).

En effet, l'absorption médiée par les récepteurs des compléments CR1 et CR3 permet l'inhibition de l'inflammation et la libération de superoxyde ainsi que l'accumulation des marqueurs lysosomaux LAMP 1 (glycoprotéine membranaire associée aux lysosomes 1) et cathepsine D dans la vacuole parasitophore. Ce choix permet ainsi de créer des conditions favorables pour le parasite. D'autre part, l'activation des récepteurs du complément avec les récepteurs de la fibronectine conduisent à une réponse inflammatoire réduisant la survie du parasite (Veras et al., 2019). Les parasites peuvent dégrader la fibronectine d'une manière gp63-dépendante.

La signalisation des récepteurs au mannose peut déclencher des voies inflammatoires et une distribution plus efficace des enzymes hydrolytiques dans le phagolysosome. La phagocytose médiée par le récepteur de Fc (FcR) présent à la surface des cellules tels que les macrophages, entraîne quant à elle une activation accrue de la NADPH oxydase sur le phagosome nouvellement formé. En effet, c'est une protéine transmembranaire qui contribue aux fonctions protectrices du système immunitaire. Après l'interaction, la liaison des parasites à la surface des macrophages peut alors se produire. Cette interaction provoque la phagocytose du parasite et la libération de différents facteurs de survies intracellulaires modifiant alors la biogenèse des phagosomes et inhibant l'induction des voies pro-inflammatoires (Gallo et al., 2010).

*Leishmania* a la capacité d'induire une interaction entre la VP et la voie endocytaire de la cellule hôte notamment avec les endosomes précoces, les endosomes tardifs et le réticulum endoplasmique. La forme promastigote est capable d'inhiber la fusion VP-endosome au cours de la phase précoce de l'infection. En effet, des études ont démontré chez *L. major* et *L. donovani* un retard de la maturation de la VP comprenant les promastigotes (Vinet et al., 2011). Les VP sont caractérisées par un enrichissement dépendant du LPG avec des facteurs de polymérisation de l'hôte tels que la F-actine. De plus, le remodelage de la VP est associé à une modification des microdomaines lipidiques associés à la membrane et à une altération de l'assemblage dépendant du LPG du complexe de la NADPH oxydase.

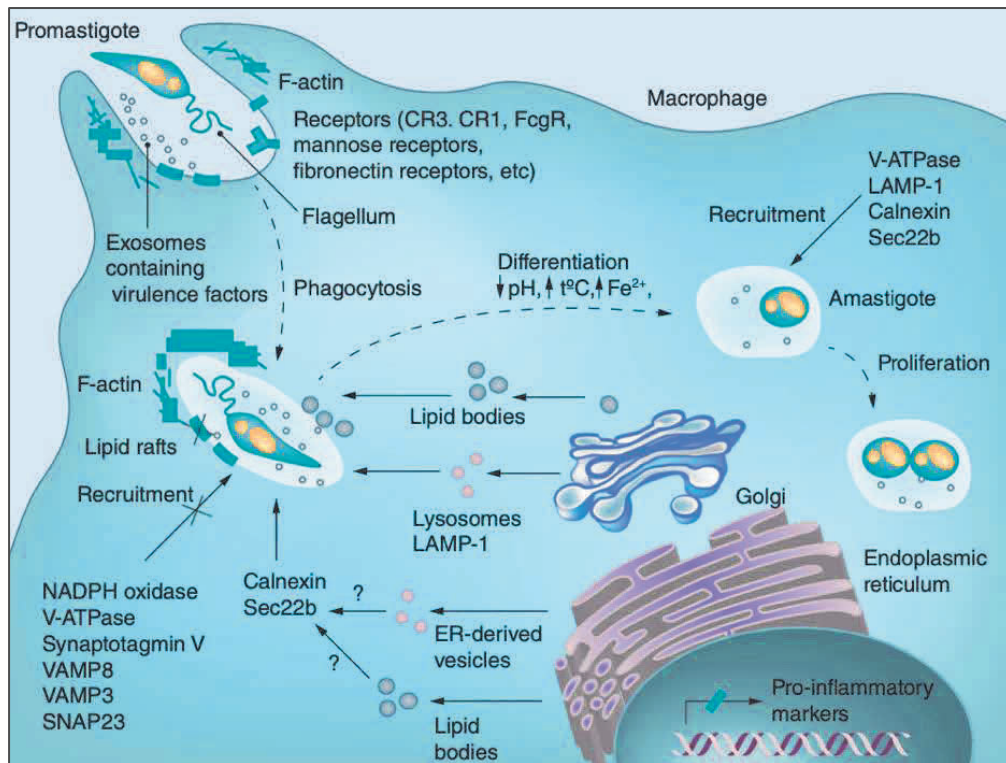
Après divers évènements de fusion avec les endosomes précoces et tardifs et les lysosomes, la membrane de la VP acquiert un ensemble de marqueurs et des composants intravésiculaires de la cellule hôte. La membrane du phagosome précoce de *Leishmania* exprime les marqueurs cavéoles GM1 et cavéoline 1, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, EEA-1 un marqueur des endosome précoce, Rab5 et Rab7, ainsi que CD68 (Liévin-Le Moal and Loiseau, 2016).

De plus, par fusion du phagolysosome avec des endosomes et des vacuoles dérivées du RE, la membrane de la VP exprime des molécules résidentes du réticulum endoplasmique telles que la calnexine, le récepteur SNARE (récepteurs solubles des protéines d'attachement aux facteurs sensibles au N-éthylmaléimide) associé à la membrane Sec22b et la syntaxine V. Sec22b est connu pour interagir avec la syntaxine V suggérant qu'il fonctionne également à l'interface entre la membrane plasmique et la membrane du réticulum endoplasmique et joue également un rôle dans la fusion des vésicules (Ndjamen et al., 2010; Wu et al., 2019).

En revanche, la membrane du phagosome précoce contenant le promastigote n'exprime pas la NADPH oxydase et la synaptotagmine V (Ndjamen et al., 2010; Vinet et al., 2011, 2009) (un membre de la famille des protéines membranaires synaptotagmines qui régule l'amarrage et la fusion des vésicules dans des processus tels que l'exocytose et phagocytose), les VAMP 3 et 8 (protéine membranaire associée aux vésicules 8), et la proton-ATPase vésiculaire (Moradin and Descoteaux, 2012).

Plus tard, le phagosome atteint sa maturation par fusion avec des endosomes et des lysosomes tardifs, entraînant l'acquisition de molécules associées aux lysosomes, notamment LAMP-1 et -2 (Courret et al., 2002; Duclos et al., 2000; Lang et al., 1994; Young and Kima, 2019) et les cathepsines B, D, H et L (Courret et al., 2002; Lang et al., 1994).

*In vitro*, ce phénomène a entraîné une diminution du pH (Antoine et al., 1998, 1990) et une élévation de température dans la VP (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Des interactions avec les composants de la voie de sécrétion de l'hôte ont également été observées dans d'autres infections parasitaires intracellulaires. C'est notamment le cas de *Toxoplasma gondii*. Des études ont démontré le recrutement des composants de la voie de sécrétion des cellules hôtes au cours de l'infection (Goldszmid et al., 2009).

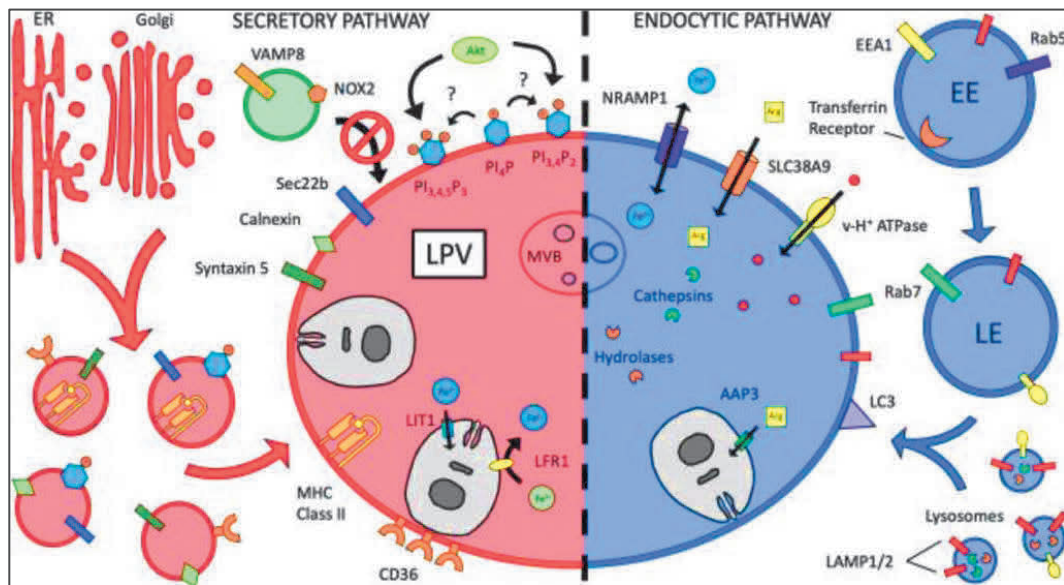


**Figure 14.** Formation de la vacuole parasitophore de *Leishmania* dans le macrophage (Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

## 2. Acquisition des nutriments et caractéristiques des vacuoles parasitophores

Les préférences nutritionnelles du parasite sont différentes selon sa forme. Les parasites séquestrés dans la vacuole doivent être capables de s'approprier les nutriments nécessaires à leur croissance, à leur survie ainsi qu'à leur réplication (Young and Kima, 2019). Ils ont des besoins nutritionnels complexes, les acides aminés et les polyamines étant d'importantes sources de carbone et de nutriments indispensables à leur croissance. La disponibilité des nutriments dans la niche intracellulaire permet la survie à long terme du parasite. *Leishmania* peut atteindre certains de ses besoins en nutriments grâce à la fusion de la VP avec les endosomes et des vacuoles dérivées du réticulum endoplasmique.

Les métabolites activement éliminés sont les hexoses, les acides aminés polyamines, les purines, les vitamines, les sphingolipides, l'hème et les cations  $Fe^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ . Afin de générer des sources alternatives d'acides aminés, source de carbone majeur, les amastigotes produisent des perméases d'acides aminés et des cystéines protéases (Naderer and McConville, 2008).



**Figure 15.** Modèle de composition de la membrane de la vacuole parasitophore de *Leishmania* (Young and Kima, 2019). Abréviations : LPV, vacuole parasitophore de *Leishmania* ; LPVM, membrane vacuole parasitophore de *Leishmania* ; ER, réticulum endoplasmique ; EE, endosome précoce ; LE, endosome tardif ; MVB, corps multivésiculaire ; PI4P, phosphoinositol-4-phosphate ; PI<sub>3,4</sub>P<sub>2</sub>, phosphoinositol-3,4-bisphosphate ; PI<sub>3,4,5</sub>P<sub>3</sub>, phosphoinositol-3,4,5-triphosphate ; LFR1, réductase ferrique de *Leishmania* 1 ; LIT1, importateur ferrique de *Leishmania* 1 ; LAMP1/2, protéines membranaires lysosomales 1 & 2 ; EEA1, antigène endosome précoce 1 ; Nramp1, protéine macrophage 1 associée à la résistance naturelle ; SLC38A9, transporteur d'arginine ; CD36, récepteur piègeur ; AAP3, *Leishmania* transporteur d'arginine de haute affinité ; NOX2, sous-unité catalytique liée à la membrane du complexe, NADPH oxydase ; VAMP8, protéine membranaire associée aux vésicules 8 ; SNARE, protéine réceptrice d'attachement soluble sensible à la NSF ; Arg, arginine.

### a. L'arginine

La récupération de l'arginine est cruciale pour la survie des amastigotes. C'est un acide aminé essentiel pour *Leishmania*, contrairement à l'hôte qui peut décomposer la citrulline en arginine. En effet, les parasites dépendent de l'arginine pour diverses activités cellulaires telles que la synthèse des protéines et la synthèse des polyamines et d'autres précurseurs métaboliques.

Lors de l'infection, le parasite induit une réponse de privation en arginine en raison de la disponibilité limitée dans la cellule hôte. L'épuisement en arginine déclenche alors une régulation positive d'un transporteur d'arginine, AAP3 par les amastigotes, permettant de satisfaire leur besoin en arginine. Les macrophages activés utilisent l'arginine pour la production d'oxyde nitrique (NO) limitant alors sa disponibilité pour *Leishmania*. Cette limitation peut contribuer au contrôle de l'infection par le macrophage classiquement activé (Naderer and McConville, 2008).

## **b. Le Fer**

Un autre nutriment essentiel pour *Leishmania* est le fer. L'hôte possède un ensemble de voies homéostatiques du fer pour maximiser la disponibilité du fer dans les cellules et à la fois minimiser les propriétés oxydantes indésirables du fer en excès. *Leishmania* exploite des molécules de l'hôte afin d'augmenter son approvisionnement en fer intracellulaire et de le détourner pour ses propres besoins. Pendant l'infection, les macrophages jouent un rôle majeur en retirant le fer de la circulation limitant ainsi le fer aux agents infectieux.

L'hépcidine, un régulateur systémique du fer, facilite alors la séquestration du fer dans les macrophages. Ces différentes tactiques utilisées par l'hôte peuvent profiter à *Leishmania* en tant que parasite intracellulaire des macrophages. En effet, une étude a démontré que les amastigotes axéniques de *L. amazonensis* sont capables de provoquer une régulation positive de l'hépcidine dépendante de TLR4 déclenchant la dégradation de la ferroportine dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse de souris (Ben-Othman et al., 2014).

Une autre molécule est impliquée dans le mouvement du fer dans la cellule : Nramp1 (Natural Resistance-Associated Macrophage Protein 1). Nramp1 est exprimée dans la membrane de l'endosome tardif et des lysosomes dans les macrophages. Elle agit comme un porteur de cation divalent dépendant du pH (Hernández-Rivera et al., 2016). Bien que le mécanisme de Nramp1 soit controversé, des études ont démontré sa présence sur la VP. La fonction principale de Nramp1 est de créer un environnement privé de  $Fe^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  à l'intérieur des phagosomes en les pompant du milieu phagosomal vers le compartiment cytosolique des macrophages. Une étude a démontré que la sécrétion des peroxydases dans le milieu des macrophages par *Leishmania* permet de contrecarrer l'agression oxydative et indirectement l'acquisition de fer via la régulation négative de l'expression de la pompe Nramp1 (Singh et al., 2013). En maîtrisant et limitant l'expression de Nramp1, les parasites peuvent contrôler davantage leur accès et leur approvisionnement en fer.

La génération d'un environnement intracellulaire avec une quantité importante de fer est essentielle pour l'infection par *Leishmania*. En effet, les parasites doivent être en mesure d'apporter le fer à la VP et de le transporter à travers celle-ci pour le rendre disponible. L'acquisition de fer par le parasite est facilitée par 3 molécules : le transporteur de fer ferreux LIT1, la fer réductase FRI1 et le transporteur de l'hème LHR1 (Podinovskaia et Descoteaux, 2015). Le LFR1 est responsable de la réduction des ions ferriques ( $Fe^{3+}$ ) en ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), LIT1 est responsable de l'importation des ions ferreux de la lumière de la VP, où le fer est ensuite disponible pour son utilisation et le LHR1 contrôle la taille du pool hémique intracellulaire. Ces 3 médiateurs sont régulés à la hausse en réponse à une faible teneur en fer. LHR1 est essentiel pour la viabilité de *Leishmania* alors que LFR1 et LIT1 sont nécessaires pour la survie intracellulaire (Flannery et al., 2011).

### **c. Les corps lipidiques**

Les corps lipidiques (LB) dans le macrophage peuvent aussi répondre à certains des besoins nutritionnels du parasite. Ceux-ci sont des organites avec un noyau de lipides neutres principalement du triacylglycérol et des esters de stérol pouvant agir comme sources de nutriments pour les parasites.

Les changements transcriptomiques des macrophages dérivés de la moelle osseuse murine à la suite d'une infection par le promastigote *L. major* indiquent des voies métaboliques des glucides et des lipides très perturbées. La synthèse améliorée du triacylglycérol et l'efflux réduit de cholestérol peuvent augmenter la disponibilité des lipides intracellulaires et faciliter la formation de macrophages spumeux. Le profil des corps lipidiques des leucocytes dendritiques infectés par des amastigotes de *L. amazonensis* était distinct sur le plan transcriptionnel de celui des cellules surchargées en lipides après un traitement à l'oléate et présentait des corps lipidiques plus volumineux et plus nombreux (Lecoeur et al., 2013).

Les corps lipidiques comportent, en plus des nutriments riches en énergie, des GTPases Rab, des protéines du réticulum endoplasmique et des chaperons moléculaires permettant d'acquérir des protéines phagosomales telles que Rab5 et Rab7. L'interaction des corps lipidiques avec les VP peut jouer un rôle dans la maturation des phagosomes et la fusion avec d'autres organites et fournir des sources de nutriments supplémentaires. En effet, les corps lipidiques induits par l'infection par *L. amazonensis* dans des leucocytes dendritiques ont été observés en étroite apposition sur la membrane de la VP.

L'étendue de l'interaction des corps lipidiques avec les VP de *Leishmania* dans les macrophages n'a pas encore été déterminée, et la contribution des corps lipidiques à la biogenèse des phagosomes de *Leishmania* et aux interactions hôte-parasite reste à explorer (Podinovskaia and Descoteaux, 2015).

## **XII. La réponse immunitaire**

### **1. La réponse innée**

Les macrophages jouent un rôle primordial dans la réponse inflammatoire innée contre le parasite. Les macrophages sont normalement au repos en tant que macrophages naïfs (M0). Cependant le microenvironnement dans lequel les cellules se trouvent fournit différents signaux qui les activent et conduisent au développement d'un phénotype « classiquement activé » (M1) ou « alternativement activé » (M2). Les désignations M1/M2 proviennent des profils de cytokines Th1 et Th2 et sont associées au changement de phénotypes des macrophages.

Le phénotype M1 est caractérisé par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 et IFN de type I), un taux de phagocytose élevé et la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote pour lutter contre les agents pathogènes intracellulaires (Covarrubias et al., 2013; Martinez and Gordon, 2014) tandis que le phénotype M2 présente des propriétés anti-inflammatoires avec la sécrétion notamment d'IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ . (Martinez and Gordon, 2014; Parisi et al., 2018). Au cours de l'infection par *Leishmania*, les macrophages de l'hôte peuvent subir à la fois une activation M1 et M2, conduisant respectivement à la mort ou à la survie du parasite. L'équilibre de la polarisation des macrophages dans la leishmaniose n'est pas entièrement compris mais pourrait dépendre de l'espèce de *Leishmania* et du moment de l'infection et de l'état immunitaire de l'hôte (Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

### **2. La réponse adaptative**

Dans la leishmaniose, l'immunité est majoritairement médiée par les lymphocytes T, ils jouent un rôle majeur dans la génération de réponses spécifiques dans l'infection à *Leishmania*. Les cellules Th1 et Th2 peuvent être distinguées via les cytokines qu'elles sécrètent. Les cellules Th1 sécrètent des activateurs de l'immunité à médiation cellulaire notamment IFN- $\gamma$  tandis que les cellules Th2 sécrètent de l'IL-4 qui favorisent la réponse humorale et la production des anticorps.



De nombreuses études ont mis en évidence que les cellules CD4<sup>+</sup> sont essentielles pour déterminer l'issue de l'infection tandis que les cellules CD8<sup>+</sup> ne jouent qu'un rôle mineur.

La réponse se produit pendant les premières heures de l'infection au niveau du site d'inoculation du parasite et dans les organes lymphoïdes. Chez la souris BALB/c, des cellules T CD4<sup>+</sup> sont détectées dans le drainage des ganglions lymphatiques dès 16h après l'infection avec *L. major* (Malherbe et al., 2000). Ces cellules se différencient alors en sécrétant des cytokines avec différents phénotypes selon la souche de souris. Les modèles les plus couramment utilisés sont les souris BALB/c et C57BL/6 infectées par *L. major*. Les souris de la souche BALB/c développent une réponse Th2 qui sécrètent IL-4, IL-5 et/ou IL-13. Les souris C57BL/6, quant à elles, développent une réponse Th1, sécrètent du TNF- $\alpha$  contribuant à l'élimination du parasite par différents mécanismes dont l'activation des macrophages. Les souris C57BL/6 représentent un modèle de résistance à *L. major* (Ribeiro et al., 2017) L'infection à *Leishmania* entraîne également l'activation des T CD8<sup>+</sup> dirigés contre le parasite. Ces lymphocytes ne semblent pas contrôler la multiplication des parasites chez les souris infectées primaires cependant, ils contribuent à la résolution rapide des lésions secondaires, probablement pas un mécanisme qui dépend de la sécrétion du IFN- $\gamma$  (Mougneau et al., 2011).

La réponse immunitaire d'autres espèces de *Leishmania* a été étudiée, notamment chez *L. braziliensis* et *L. amazonensis*. Les mécanismes de sensibilité ne sont pas aussi clairement liés à une réponse Th2 comme dans le modèle de *L. major*. Cependant, le contrôle de la croissance des parasites dépend également de l'IFN- $\gamma$  et d'autres cytokines inflammatoires. Dans le cas où les souris BALB/c ont été infectées avec *L. braziliensis*, une sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  a été observée mais aucune réponse Th2 n'est induite même en l'absence d'IL-12 (nécessaire au développement d'une réponse immunitaire Th1) (Ribeiro et al., 2017).

Comme dans la leishmaniose cutanée humaine, aucune association entre les réponses Th1 et Th2 et la résistance de la maladie n'a été identifiée dans la leishmaniose viscérale humaine. Les niveaux d'IFN- $\gamma$  et d'IL-4 sont élevés pendant la maladie et diminuent une fois la guérison. Les cellules mononuclées sanguines périphériques présentent une faible réponse proliférative aux antigènes parasites et ne génèrent pas d'IFN- $\gamma$  *in vivo*. Ce manque de production d'interféron semble prédire la progression de l'infection dans la leishmaniose viscérale (Tripathi et al., 2007).

Chez l'homme, une corrélation positive a été observée entre des niveaux élevés d'ARNm IL-10 intra-lésionnel et l'échec thérapeutique. Il a été démontré notamment, qu'une forte production d'IL-10 était corrélée à une réponse proliférative lymphocytaire déficiente et à de faibles taux d'IFN- $\gamma$  chez les patients présentant des lésions antérieures de la leishmaniose cutanée.

Les études actuelles indiquent qu'un schéma mixte de réponse immunitaire à médiation cellulaire a lieu pendant la maladie et que la guérison est associée à une baisse de la production d'IL-4 et d'IL-10, des cytokines capables de bloquer la production d'IFN- $\gamma$  et l'activation des macrophages suggérant que la maladie est associée à la présence de cytokines régulatrices plutôt qu'à l'absence d'IFN- $\gamma$  lui-même. Le TNF- $\gamma$  joue un double rôle, il agit d'abord sur le contrôle des parasites par sa capacité à promouvoir l'activation des macrophages et plus tard à favoriser les lésions. Les différentes études suggèrent que l'IL-4 et l'IL-10 sont des facteurs déterminants de la sensibilité de l'Homme à l'infection à *L. braziliensis* (Castellano et al., 2009).

### **XIII. Mécanisme de défenses des macrophages**

#### **1. Dommage oxydatif**

Les cellules immunitaires génèrent en continu des oxydants et des composés inflammatoires afin de remplir leurs fonctions défensives et limiter la prolifération des micro-organismes pathogènes voire les détruire. La génération d'espèces réactives oxygénées (ROS) et l'intermédiaire azoté réactif (RNI) sont des moyens majeurs utilisés par les phagocytes, notamment les macrophages, pour se défendre des agents pathogènes. Des quantités importantes de ROS et de radicaux libres sont produites afin de détruire le développement du micro-organisme (Vida et al., 2017).

Au cours de son cycle de vie, *Leishmania* rencontre et s'adapte à diverses conditions hostiles telles que le stress oxydatif, la lyse médiée par le complément et les ROS générés lors de la phagocytose par les macrophages de l'hôte (Carneiro et al., 2016). La production des ROS est stimulée par l'assemblage de la NADPH oxydase avec un phagosome contenant le parasite conduisant à une libération de superoxyde localisé dans la lumière du phagosome. La production de ROS a été observée dans des macrophages infectés par *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, très probablement comme mécanisme de défense pour éliminer les parasites (Carneiro et al., 2016; Reybier et al., 2010; Thomazelli et al., 2018).

Deux molécules sont essentielles afin de contrôler l'infection à *Leishmania* : l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) et l'oxyde nitrique (NO). Pendant la phase initiale d'infection, le superoxyde est produit dans le cadre de la réponse oxydative des macrophages suite à la phagocytose. L'oxyde nitrique est généré après activation des macrophages par l'IFN- $\gamma$  et le TNF. L'oxyde nitrique est dérivé de l'oxydation de l'azote guanidine terminal de la L-arginine par une enzyme dépendante du NADPH, la NO synthase.

Dans les systèmes murins, l'IFN- $\gamma$  s'est révélé synergique avec le TNF, pour activer la synthase inductible de l'oxyde nitrique (iNOS ou NOS2) afin de produire de l'oxyde nitrique (NO) entraînant l'éradication des parasites intracellulaires (Carneiro et al., 2016).

De récentes découvertes ont démontré que l'oxyde d'azote (NO) est produit après assemblage des inflammasomes Nlrp3 dans les macrophages infectés par des promastigotes de *L. amazonensis* et aide à contrôler l'infection. Le Nlrp3 activé stimule la production d'IL-1 $\beta$ , qui, grâce à IL-1R et MyD88, induit le NOS2 à produire du NO (Lima-Junior et al., 2013). Le récepteur purinergique activé par l'ATP P2X7 induit un assemblage d'inflammasome et participe à la restriction ultérieure de la croissance des promastigotes de *L. amazonensis* dans les macrophages dérivés de la moelle osseuse.

## 2. Modification du métabolisme des lipides

Les altérations du métabolisme lipidique de la cellule hôte et la présence accrue des gouttelettes lipidiques apparaissent comme une caractéristique commune des infections intracellulaires. Elles jouent notamment un rôle dans la régulation du stockage et le renouvellement des lipides dans différentes cellules (Rabhi et al., 2016). L'infection à *Leishmania* entraîne des altérations des voies métaboliques lipidiques des cellules, dont les gouttelettes lipidiques sont d'importants acteurs. Les interactions de ces gouttelettes lipidiques avec les phagosomes permettent à *Leishmania* d'avoir une source d'énergie et d'impact sur sa survie. Ceci est d'autant plus important chez *Leishmania* puisqu'il doit piéger les lipides de l'environnement hôte.

Les gouttelettes de l'hôte sont des domaines intracellulaires majeurs impliqués dans la synthèse des eicosanoïdes avec de nombreuses fonctions dans l'inflammation et la signalisation immunitaire. Ces molécules sont des médiateurs de l'inflammation pouvant inhiber ou dans ce cas, améliorer la survie du pathogène. Une étude a démontré la co-localisation de ces gouttelettes au niveau des vacuoles parasitophores de *L. major*.

Cette association peut permettre le flux de nutriments entre l'hôte et le parasite (Rabhi et al., 2016). Les AG dérivés de ces réservoirs lipidiques peuvent être également utilisés pour la production d'énergie (Vallochi et al., 2018).

Chez les promastigotes, l'oxydation des acides gras se produit en faible quantité en raison de leur multiplication rapide, tandis que chez les amastigotes, elle se produit à un rythme accru (Naderer and McConville, 2008).

Les eicosanoïdes, molécules d'origine lipidique, participent à l'amplification de la réponse inflammatoire en régulant la réponse immunitaire aux pathogènes intracellulaires. Dans les infections à *Leishmania*, le parasite induit une régulation transcriptionnelle à la hausse des gènes liés à certaines protéines et enzymes impliquées dans la production de prostaglandines, dont les eicosanoïdes (Martinez and Gordon, 2014). Au cours de la métacyclogenèse de *L. infantum*, les gouttelettes lipidiques sont les sites intracellulaires de production des prostaglandines favorisant l'infection des macrophages (Aquino et al., 2021).

Dans les infections à *L. infantum* et *L. donovani*, des altérations du profil lipidique de l'hôte peuvent entraîner une hypertriglycéridémie. L'hypertriglycéridémie est largement observée dans différentes infections et peut être appliquée comme étant un indicateur de la gravité de la maladie puisque les niveaux de TAG diminuent après la résolution des maladies (Lal et al., 2016).

#### **XIV. Mécanisme d'évasion de *Leishmania***

##### **1. Diminution de l'inflammation**

*Leishmania* utilise un certain nombre de mécanismes pour contrer les défenses de l'hôte. Plusieurs études ont mis en évidence une suppression de l'IL-12 dans les macrophages infectés par *Leishmania* et stimulés par du LPS. La suppression de l'IL-12 induite par le LPS par *L. mexicana* semble corrélée à la dégradation des MAP kinases JNK et ERK dans l'immunité innée, ainsi que des composants de la voie de signalisation NF-kB (Cameron et al., 2004).

Des mécanismes supplémentaires ont été mis en exergue : *Leishmania* aurait la capacité d'inhiber l'activation inflammatoire notamment les récepteurs de surface des macrophages associés à la suppression tel que le récepteur du complément 3 (CR3) et l'élaboration de cytokines suppressives telles que l'IL-10.

En effet, différentes études sur les macrophages de souris déficientes en CR3 ont confirmé que le CR3 est impliqué dans la suppression de l'IL-12 pendant l'infection à *Leishmania* même en présence d'une stimulation par IFN- $\gamma$  (Carter et al., 2009).

*Leishmania* est capable de cibler de multiples voies de signalisation dans le macrophage pour réduire l'inflammation induite par l'infection. En effet, dès l'inoculation des parasites, le gel sécrétoire riche en protéophosphoglycane produit par les parasites améliore l'activation alternative et l'activité arginase des macrophages hôtes pour favoriser la survie de *L. mexicana*. L'infection des macrophages péritonéaux murins par des promastigotes de *L. amazonensis* a entraîné une suppression des réponses inflammatoires induites par le LPS, ainsi que la production de trois cytokines : IL-12, IL-17 et IL-6. *Leishmania* a également augmenté les cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS, IL-1 $\alpha$ , TNF, MIP-1 $\alpha$  et MCP-1 et la cytokine anti-inflammatoire IL-10. *Leishmania* peut posséder une sélectivité sur la manipulation de certaines cytokines afin de stimuler un état d'activation unique dans le macrophage approprié à la survie du parasite (Lapara and Kelly, 2010).

## 2. Échappement aux dommages du stress oxydatif

Selon les espèces de *Leishmania* et le type de cellule hôte la réponse au stress oxydatif varie. En effet, *Leishmania* utilise différentes approches afin de contrer le stress oxydatif. Une étude a démontré que des formes amastigotes axéniques de *L. donovani* ont altéré les ROS cellulaires et mitochondriales via l'induction de la protéine de couplage mitochondriale 2 (UCP2). En effet ces amastigotes axéniques ont dégradé le facteur de transcription USF-1 permettant le recrutement des facteurs de transcription SREBP2 (protéine 2 de liaison des éléments régulateurs des stérols) et Sp1 (site de liaison spécifique protéine 1) vers le promoteur UCP2, la régulation positive de l'UCP2 (protéine découplante 2) et l'inhibition de ROS. *Leishmania* est aussi capable d'éviter les dommages oxydatifs en empêchant l'assemblage de la NADPH oxydase au niveau de la membrane phagosomale. Le complexe NADPH oxydase permet de catalyser la production de radicaux superoxyde, qui tuent ensuite les micro-organismes ingérés. Dans les infections à *Leishmania*, l'assemblage complet de la NADPH oxydase sur la membrane de la vacuole parasitophore est inhibé, permettant une diminution de la production de radicaux superoxyde (Young and Kima, 2019).

Le lipophosphoglycane (GPL) est un glycolipide de surface qui joue un rôle important dans l'établissement des infections à *Leishmania*. Des études ont démontré, chez *L. donovani*, que celui-ci pouvait inhiber le recrutement de 2 sous unités de la NADPH oxydase au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore ; phox<sup>p47</sup> et phox<sup>p67</sup> (Lodge et al., 2006). Cependant, il n'altère pas la formation de complexes contenant ces deux sous-unités. En effet, c'est le remodelage de la vacuole parasitophore et l'exclusion des sous unités de la NADPH oxydase qui sont les éléments de l'évasion et la destruction du superoxyde.

Même si l'oxyde d'azote peut exercer ses effets à distance, différentes études ont évalué la localisation d'iNOS dans les cellules infectées par *Leishmania*. L'oxyde d'azote peut être produit par un traitement avec du TNF $\alpha$  ou de l'IFN- $\gamma$  qui induit l'activation de l'iNOS. Des études ont démontré qu'il était recruté dans les membranes d'autres compartiments contenant des agents pathogènes (Chakravortty et al., 2002). L'inhibition de la production de NO par l'iNOS favorise la croissance intracellulaire de *Leishmania* dans les macrophages (Kumar et al., 2018).

## **XV. Les méthodes de diagnostic**

Le diagnostic est basé sur des caractéristiques cliniques, biologiques et parasitologiques. De nombreuses méthodes ont été décrites avec une grande variation dans la précision du diagnostic. On retrouve des examens parasitologiques directs et/ ou des tests indirects avec notamment de la sérologie et du diagnostic moléculaire.

### **1. Diagnostic clinique**

Le polymorphisme clinique des leishmanioses cutanées peut simuler de nombreuses autres dermatoses. Chez une personne ayant séjourné ou habitant dans une zone endémique, toute lésion cutanée persistante plus de 2 semaines ou rebelles aux traitement locaux doit faire évoquer le diagnostic de la leishmaniose et faire un prélèvement à visée diagnostique.

La leishmaniose viscérale s'exprime par des symptômes plus importants notamment de la fièvre, une pâleur, de l'asthénie, un amaigrissement, une splénomégalie ou une hépatomégalie.

## **2. Diagnostic parasitologique**

Le diagnostic parasitologique est considéré comme l'étalon d'or dans le diagnostic des leishmanioses du fait de sa haute spécificité. Il repose sur la mise en évidence du parasite notamment en effectuant un examen histopathologique de tissus fixés ou de culture *in vitro* à partir de matériel provenant de la lésion ou sur la mise en évidence de son ADN.

### **a. Les prélèvements**

#### **• Leishmaniose viscérale**

La méthode couramment utilisée est la mise en évidence du parasite par aspiration splénique ou médullaire. La procédure d'aspiration splénique présente un risque d'hémorragie dans 1/1000 cas. Dorénavant, ce sont des ponctions de moelle osseuse qui sont pratiquées au sternum ou à la crête iliaque chez les jeunes enfants.

La recherche d'ADN dans le sang est privilégiée d'autant plus que la ponction médullaire est invasive. Le prélèvement peut aussi être réalisé sur la rate, le foie, les ganglions lymphatiques, la muqueuse digestive ou le liquide bronchoalvéolaire.

#### **• Leishmaniose cutanée**

Les prélèvements sont effectués au niveau de la bordure de la lésion par grattage ou écouvillonnage.

### **b. La recherche des parasites**

L'examen microscopique est l'approche la plus couramment utilisée car les techniques plus sophistiquées sont coûteuses et rarement disponibles dans les zones endémiques. L'identification microscopique consiste en l'identification directe des formes amastigotes dans les frottis de lésions colorées au Giemsa ou des frottis. Les parasites apparaissent sous forme amastigote, intracellulaire dans les macrophages ou extracellulaire. La sensibilité est variable selon le tissu : elle est supérieure à 90% dans la rate contre 50 à 80% dans la moelle osseuse. La sensibilité augmente avec le temps de lecture et le nombre de champs examinés au microscope. Les échantillons de sang ont une faible sensibilité sauf chez les patients co-infectés par le VIH qui ont une parasitémie augmentée (Burza et al., 2018). Le matériel de biopsie, après inclusion et coupe peut être coloré révélant la structure histologique du granulome.

Plus rarement, un immunomarquage peut être effectué à l'aide de sérum de souris anti-*leishmania* conjugué à la peroxydase.

Les prélèvements peuvent tout aussi bien être ensemencés sur des géloses à 10% de sang de lapin additionné d'antibiotique et de NaCl ou en milieu diphasique Novy-Neal-Nicolle (NNN). Ils peuvent être ensemencés en milieux liquides de type Schneider, de Grace ou M199 supplémentés de sérum de veau fœtal. Les parasites sont sous forme promastigotes. L'incubation se fait à 24-26°C. Il faut alors attendre une semaine afin de conclure à un test négatif.

### **c. Les méthodes moléculaires**

Ces méthodes sont très sensibles et permettent l'identification des différentes espèces de *Leishmania*. Elles sont basées sur l'amplification de l'ADN nucléaire ou du kinétoplaste. Ici encore, l'échantillonnage des tissus est primordial pour améliorer la sensibilité du test. Le diagnostic est effectué par PCR, il est particulièrement utilisé dans les cas à faible charge parasitaire.

Lors que les techniques simples échouent, par exemple dans des lésions de muqueuse où les parasites sont sporadiques et chroniques, les techniques moléculaires comme la PCR en temps réel de L'ADNc se sont révélées comme très précises pour la détection et la quantification des espèces de *Leishmania*. Selon les espèces de *Leishmania* et les équipes, diverses cibles moléculaires sont utilisées.

La sensibilité de ces tests est augmentée de 55 à 70% dans la leishmaniose cutanéomuqueuse par rapport au diagnostic parasitologique (Reithinger et al., 2007). Jusqu'à présent, l'utilisation combinée de méthodes parasitologiques classiques avec détection par PCR offre une meilleure approche pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée (Burza et al., 2018).

### **3. Diagnostic immunologique**

Plusieurs tests sérologiques sont disponibles, notamment le test d'agglutination directe, l'ELISA, l'immunofluorescence et le western blot. Ces techniques de détection des anticorps ont une sensibilité élevée aux maladies viscérales. Les anticorps ne diminuent que lentement après la guérison et sont également présents chez un grand nombre d'individus infectés symptomatiquement par conséquent, les résultats sérologiques doivent être interprétés dans le contexte des antécédents cliniques. De plus, plusieurs de ces tests sont trop compliqués pour être utilisés dans des zones endémiques.



### **a. Détection d'anticorps**

Plusieurs tests détectant des anticorps anti-leishmaniaux spécifiques ont été développés, mais tous ont deux limitations majeures. Les taux sériques d'anticorps diminuent après un traitement réussi mais ils restent détectables jusqu'à plusieurs années après la guérison. C'est pourquoi, la rechute de la leishmaniose viscérale ne peut pas être diagnostiquée par sérologie.

Deuxièmement, une proportion importante d'individus en bonne santé vivant dans des zones d'endémie sans antécédents de la leishmaniose viscérale est positive pour les anticorps anti-leishmaniaux en raison d'infections asymptomatiques.

La séroprévalence dans les populations saines varie de moins de 10% dans les zones d'endémie faible à modérée à plus de 30% dans les foyers à transmission élevée.

Les tests sérologiques basés sur l'anticorps à fluorescence indirecte (IFA), le dosage immuno-enzymatique (ELISA) ou le western blot ont montré une grande précision diagnostique dans la plupart des études mais sont mal adaptés aux paramètres de terrain.

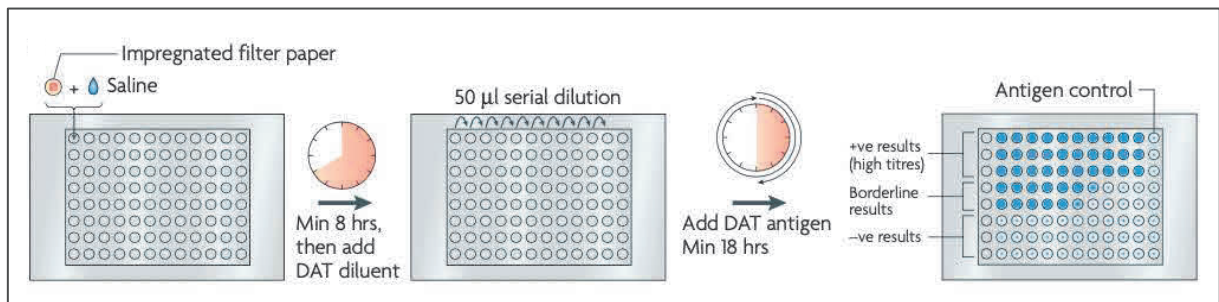
Deux tests sérologiques ont été spécifiquement développés pour une utilisation sur le terrain :

- **Le test d'agglutination directe (DAT)**

Le test d'agglutination direct est le test sérologique qui a la sensibilité et la spécificité les plus robustes sur le terrain dans toutes les régions endémiques (Kühne et al., 2020). C'est un test semi-quantitatif qui utilise des plaques de microtitration dans lesquelles des dilutions croissantes de sérum ou de sang du patient sont mélangées avec des parasites sous formes promastigotes de *L. donovani* tués. Si des anticorps spécifiques sont présents, l'agglutination est visible après 18 heures à l'œil nu. La performance de ce test n'est nullement influencée par la région ou l'espèce de *Leishmania*. En effet, l'antigène lyophilisé est plus robuste que l'antigène liquide. Ce test possède tout de même quelques inconvénients notamment l'équipement et le personnel qualifiés et formés ainsi que la fragilité de l'antigène.

Bien que ce test ait démontré un haut degré de répétabilité, sa reproductibilité au sein des centres est assez faible. Les conditions difficiles sur le terrain ainsi que les variabilités de l'antigène d'un lot à l'autre, le manque de chaîne de froid et la non-normalisation des résultats ont limité considérablement son application (Kühne et al., 2020).

Le test de dépistage rapide par agglutination (FAST) est une version simplifiée et plus rapide (2–3 heures) que le DAT, et sa précision diagnostique semble comparable, mais une validation supplémentaire est nécessaire.



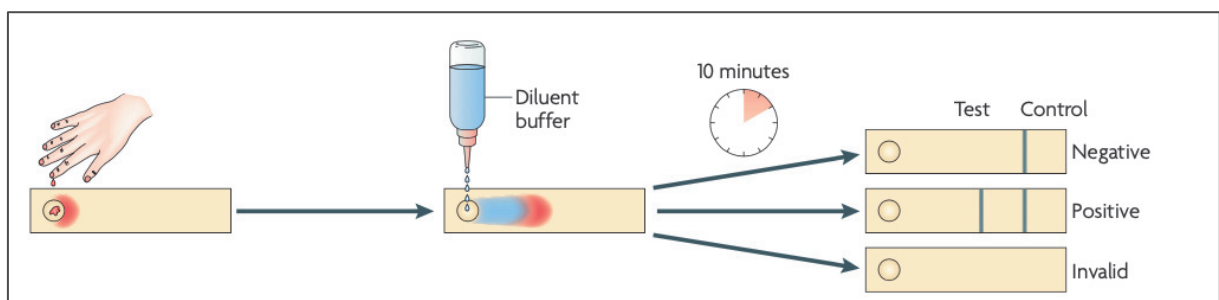
**Figure 16.** Test d’agglutination directe (Chappuis et al., 2007).

- **Le test immunochromatographique (ICT) basé sur rK39**

L’ICT est le test de détection le plus largement utilisé et le plus adapté au terrain. Il est basé sur l’antigène rK39 qui est un antigène recombinant comprenant 6,4 répétitions d’un acide aminé de 39 extensions d’une protéine apparentée à la kinésine dans *L. infantum* et qui est conservée dans le complexe *L. donovani* (Kühne et al., 2020).

Un ELISA basé sur rK39 a montré une excellente sensibilité : de 93 à 100% et une excellente spécificité : de 97–98% dans de nombreux pays où la LV est endémique (Burns et al., 1993). Ensuite, le test a été développé dans un format ICT, plus adapté à une utilisation sur le terrain. Récemment, la performance diagnostique du rK39 ICT a été confirmée en Inde et au Népal (Kühne et al., 2020; Sundar et al., 2007). Malheureusement la sensibilité est variable dans les populations d’Afrique de l’Ouest et de l’EST (Boelaert et al., 2008; Kühne et al., 2020). La diversité des séquences du gènes K39 des souches de *L. donovani* peut être à l’origine de ce manque de sensibilité.

Les ICT rK39 sont faciles à effectuer, ils sont rapides (10 à 20 minutes), bon marché et donnent des résultats reproductibles.



**Figure 17.** Le test immunochromatographique basé sur rK39 (Chappuis et al., 2007).

## **b. Détection d'antigène**

Les tests de détection d'antigène devraient être plus spécifiques que les tests de détection d'anticorps car ils évitent la réactivité croisée et peuvent distinguer les infections actives des infections passées. Cette méthode fait ses preuves notamment lorsque la production d'anticorps est déficiente comme c'est le cas des patients immunodéprimés atteints du VIH (Sundar and Rai, 2002).

Un nouveau test d'agglutination au latex, Katex détecte un antigène glucidique stable de faible poids moléculaire (5–20 kDa) dans l'urine de patients atteints de leishmaniose viscérale. Plusieurs études menées en Afrique de l'Est et dans le sous-continent indien ont montré une spécificité élevée (93%) mais une sensibilité modérée (48–87%). Le test d'agglutination au latex était bien corrélé à la guérison dans une proportion élevée (97-100%) de patients pendant le traitement anti-leishmanien. Il existe cependant deux limites pratiques, d'une part l'urine doit être bouillie pour éviter les réactions faussement positives, d'autre part, il est difficile de distinguer les résultats faiblement positifs des résultats négatifs, ce qui affecte la reproductibilité du test (Chappuis et al., 2007).

D'autres outils de diagnostic peuvent être utilisés, notamment dans le cas de la leishmaniose viscérale américaine avec la technique de l'hypersensibilité retardée (DTH) ou test du Monténégro. C'est un marqueur de la réponse immunitaire cellulaire mesurant la réaction d'hypersensibilité de type retardée. Cette méthode consiste à injecter l'antigène (des parasites entiers tués) en intradermique sur la face palmaire de l'avant-bras du patient. Après 48 à 72h la taille de l'induration est mesurée puis comparée à l'induration produite par un témoin phénol-salin dans l'autre bras (Sundar and Rai, 2002). Le test est considéré comme positif lorsque l'induration mesurée est supérieure à 5mm. Ce test cutané est utilisé dans le diagnostic mais il peut révéler des infections présentes ou passées même chez les patients asymptomatiques.

Il est plus approprié de l'utiliser dans les études épidémiologiques (Goto and Lauletta Lindoso, 2012).

## **X. Les traitements**

### **1. Les antimoniés pentavalents**

Les antimoniés pentavalents sont les médicaments de première intention utilisés pour traiter les leishmanioses viscérale, cutanée et cutanéomuqueuse. Développé en 1945, l'antimoniate de N-méthyl-glucamine (Glucantime®) est le traitement le plus utilisé notamment au Brésil et dans les pays francophones. Dans les pays anglophones, c'est un autre antimonie pentavalent qui est utilisé : le stibogluconate de sodium (Pentostam®) (SbV)

Pour être actif contre *Leishmania*, le SbV doit pénétrer dans la cellule hôte, traverser la membrane phagolysosomale et agir contre les amastigotes intracellulaires. De plus, pour que l'antimoine soit actif il faut que sa forme pentavalente (SbV) se réduise en sa forme trivalente (SbIII) (Podinovskaia and Descoteaux, 2015). Les détails du mécanisme d'action ne sont actuellement pas clairs. Une étude a démontré que seuls les amastigotes peuvent réduire le SbV en SbIII (Shaked-Mishan et al., 2001). D'autres études suggèrent que la réduction a lieu dans le macrophage (Sereno et al., 1998). Ces résultats ne sont pas incompatibles, la réduction peut aussi bien avoir lieu dans le macrophage que chez le parasite.

Dans le Nouveau Monde, principalement au Brésil, l'efficacité de ces médicaments est supérieure à 90% tandis qu'au Bihar, en Inde et au Népal l'échec du traitement est d'environ 60%. Le mode d'administration est l'injection intramusculaire. Ils sont administrés pendant 20 jours consécutifs (Goto and Lauletta Lindoso, 2012).

### **2. L'amphotéricine B**

Antibiotique polyénique isolé de *Streptomyces nodosus* d'abord utilisé comme antifongique dans le traitement des mycoses systémiques, il est actuellement utilisé comme un puissant anti-leishmanien pour combattre les formes graves notamment la leishmaniose viscérale ou résistante aux antimoniés. Il est administré par voie parentérale et agit à la fois sur les promastigotes et les amastigotes en ciblant l'ergostérol dans la membrane superficielle du parasite, conduisant à une augmentation de sa perméabilité. L'antibiotique agit également sur les macrophages en stimulant leurs capacités phagocytaires mais il présente une forte toxicité rénale et hématologique.

Dans le nouveau monde, principalement au Brésil, l'amphotéricine B a été utilisée avec succès pour traiter la leishmaniose viscérale dans des conditions particulières, notamment chez des patients plus âgés, des enfants, des receveurs de transplantation et les patients présentant des comorbidités telles que le diabète et l'infection par le VIH.

Il existe quatre formulations d'amphotéricine B à usage clinique : le désoxycholate amphotéricine B, amphotéricine liposomale B, la dispersion colloïdale d'amphotéricine B et le complexe lipidique d'amphotéricine B (Goto and Lauletta Lindoso, 2012).

L'amphotéricine B liposomale est moins toxique que l'amphotéricine B et est plus efficace. Elle a été utilisée dans le cas de traitement de la leishmaniose viscérale ou cutanée.

Actuellement, c'est le traitement de première intention notamment dans les pays développés : en Europe et dans le sous-continent Indien ainsi qu'aux États-Unis car il s'agit du seul traitement approuvé par la Food and Drug Administration. Son coût élevé limite une plus grande diffusion malgré l'aide de l'OMS avec des programmes pour le rendre plus disponible dans différentes zones endémiques. Pour la leishmaniose viscérale c'est le traitement le moins toxique et le plus efficace (Polonio and Efferth, 2008).

### **3. La pentamidine**

La pentamidine est une dibenzamidine interférant avec la synthèse de l'ADN de *Leishmania* agissant sur le kinétoplaste et sur la membrane mitochondriale. Ce traitement est utilisé pour la leishmaniose cutanéomuqueuse et/ou viscérale résistante aux antimonies pentavalents. Seul l'iséthionate de pentamidine est actuellement commercialisé sous le nom de Pentacarinat.

Dans les zones où la leishmaniose cutanée est endémique en raison de *L. guyanensis*, la pentamidine a été utilisée avec succès : utilisation de 2 doses intramusculaires de 4 mg/kg les jours 1 et 4. Dans les zones où l'infection est causée par *L. braziliensis* : utilisation de 3 doses intramusculaires de 4mg/Kg les jours 1, 3 et 5. La dose maximale est de 300 mg/journée. Les principaux effets indésirables sont l'hypotension, les myalgies, les abcès au site d'injection, l'hypoglycémie et le diabète (Ouellette et al., 2004).

#### 4. La miltéfosine

La miltéfosine est un alkyl-lysophospholipide développé initialement pour le traitement du cancer mais qui s'est révélé être un anti-leishmanien efficace. En effet, c'est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. La miltéfosine inhibe la biosynthèse des phospholipides et des stérols de *Leishmania*. Elle est utilisée pour traiter la leishmaniose viscérale modérée dans le sous-continent Indien où elle présente une grande efficacité (guérison de 94% des infectés) (Carnielli et al., 2018). En revanche dans le Nouveau Monde, ce traitement est moins efficace qu'un antimonié pentavalent.

Le faible taux de guérison est inconnu mais peut être associé à une résistance naturelle à la miltéfosine par la population dans cette région. De plus, son utilisation est limitée notamment parce qu'il est toxique pour les systèmes gastro-intestinaux, hépatique et rénale. De plus, il est tératogène.

#### 5. La paromomycine

La paromomycine est un antibiotique aminoglycoside à spectre large isolé de *Streptomyces krestomuceticus*. Ce traitement est utilisé pour le traitement des leishmanioses viscérales mais peut être également utilisé dans le traitement de la leishmaniose cutanée dues à *L. major* (Goto and Lauletta Lindoso, 2012). Dans le cas de *L. tropica* son efficacité est moins importante. Son mode d'action n'est pas complètement élucidé, cependant les études suggèrent que la paromomycine exercerait une influence sur la dépolarisation de la chaîne respiratoire. Une fois que celle-ci est liée à la membrane du parasite, elle est internalisée par endocytose puis entre dans la mitochondrie causant un dysfonctionnement respiratoire

En Afrique de l'Est, l'efficacité de la paromomycine s'est avérée inférieure à l'efficacité de la miltéfosine contre la leishmaniose viscérale, et il est donc recommandé d'utiliser une dose plus élevée ou d'utiliser le médicament en association avec un antimonié pentavalent. Il n'y a eu aucun essai avec la paromomycine dans le Nouveau monde à ce jour (Goto and Lauletta Lindoso, 2012).

Le traitement local dans les essais cliniques utilisant la paromomycine, contre la leishmaniose cutanée, formulé sous forme de topiques, a donné des résultats variables allant d'un taux de guérison de 64% en Colombie à un taux de guérison de 88,6% dans une étude en double aveugle au Guatemala.

La différence dans les taux de guérison peut être liée aux espèces de *Leishmania* qui sont répandues dans chaque zone. Actuellement, dans le Nouveau Monde, le traitement topique de la leishmaniose cutanée n'est pas recommandé, sauf en cas d'infection par *L. mexicana* ou dans les zones où les formes sévères de la maladie sont très rares, comme au Venezuela et en Colombie (Davies et al., 2000).

## **6. Autres anti-leishmaniens**

### **a. Les imidazolés et les triazolés**

Les imidazoles (par exemple, le kétoconazole) et les triazolés (par exemple, le fluconazole, l'itraconazole) sont utilisés contre la leishmaniose cutanée dans le Nouveau Monde. Ils partagent le même spectre antifongique et le même mécanisme d'action, cependant, les triazolés sont métabolisés plus lentement, interfèrent moins avec la synthèse des stérols humains et sont donc moins toxiques que les imidazoles. Un grand avantage de ces composés est qu'ils peuvent être administrés par voie orale et que le profil d'effets secondaires est moins toxique que les antimoniaux pentavalents recommandés (Mitropoulos et al., 2010).

### **b. L'acide glycyrrhizique**

L'acide glycyrrhizique, principal composant de *Glycyrrhiza glabra*, a été testé en tant que composé anti-leishmanien potentiel. Le composé est capable d'inhiber les promastigotes et les amastigotes intracellulaires de façon dose dépendante. Il affecte la voie de biosynthèse des stérols, en particulier en inhibant l'enzyme HMG-CoA réductase de *L. donovani* en modifiant les niveaux d'ergostérol (Dinesh et al., 2017).

### **c. Immunothérapie**

Depuis plus d'une décennie, au Venezuela, la leishmaniose cutanée est traitée avec l'immunothérapie : l'association de promastigotes tués par chaleur avec le BCG. L'efficacité thérapeutique est de 95%, tandis qu'il y a une très faible incidence d'effets secondaires. Le traitement consiste en 3 injections au cours d'une période de 12 à 16 semaines (Convit et al., 2003).

#### **d. Méthode physique**

Des mesures physiques comme la cryothérapie, le curetage, l'électrodessication et l'excision chirurgicale sont des traitements des petites lésions cutanées précoces. Ils représentent une alternative lorsque le coût et les effets nocifs empêchent l'utilisation des agents de première intention ou lorsque le traitement est indiqué notamment en cas de grossesse (Mitropoulos et al., 2010).

A ce jour, aucun des médicaments disponibles ne remplit les conditions nécessaires pour une thérapie efficace, à savoir, une faible toxicité, une administration facile et un faible coût et sans induire de résistances médicamenteuses chez le parasite.



## Chapitre 2

### I. Classification des lipides

Les lipides sont des molécules biologiques définies comme des substances hydrophobes solubles dans les solvants organiques. La classification des lipides est basée sur leur biosynthèse et leur structure chimique. Ils sont divisés en 8 catégories distinctes, on y retrouve les acides gras, les glycérolipides, les glycérophospholipides ou phospholipides, les sphingolipides, les stéroïdes, les prényls, les saccharolipides et les polykétides (Figure 1).

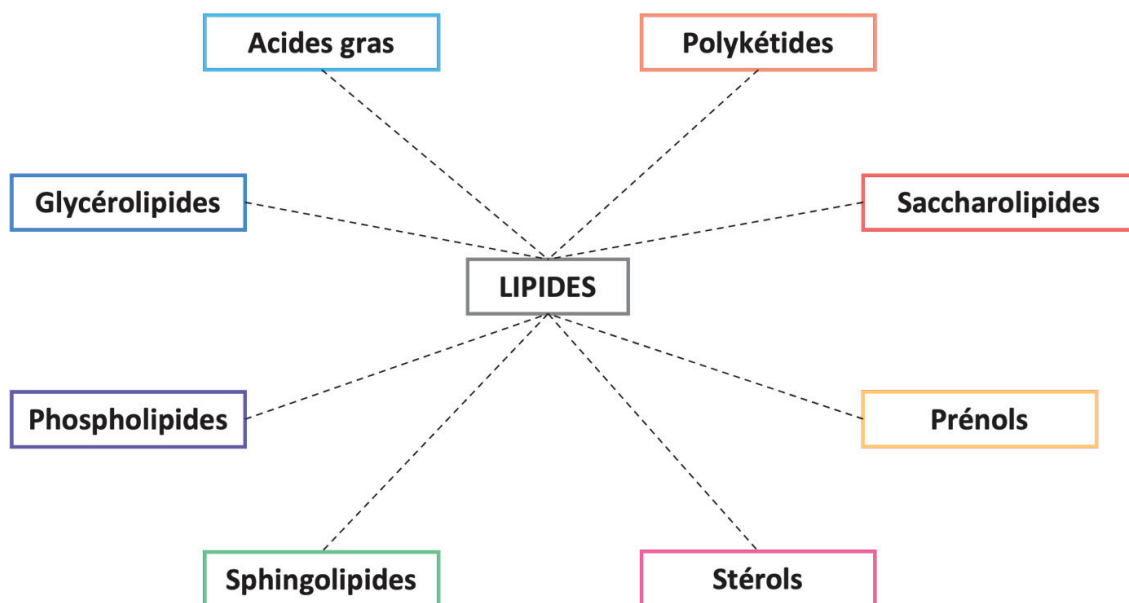


Figure 18. Classification des lipides.

Les glycérophospholipides ou phospholipides (PL) sont les constituants majeurs des membranes biologiques comprenant notamment la phosphatidylcholine, la phosphatidyléthanolamine, la phosphatidylsérine, le phosphatidylinositol et l'acide phosphatidique. La phosphatidylcholine (PC) représente plus de 50% des PL dans les membranes des eucaryotes. Les principaux lipides non polaires des membranes cellulaires sont les stéroïdes. Le cholestérol prédomine chez les mammifères tandis que l'ergostérol prédomine chez les levures ou les parasites (van Meer et al., 2008). Une autre classe de lipides est retrouvée dans ces membranes mais en plus faible quantité : les sphingolipides. Le caractère amphiphile de ces différents lipides est à l'origine de la formation des membranes en milieu aqueux, notamment de bicouche lipidique mesurant de 6 à 10 nm d'épaisseur dans lequel s'insèrent des protéines.

En effet, les parties hydrophiles interagissent entre elles et avec l'environnement aqueux, tandis que les parties hydrophiles se condensent en interagissant les unes avec les autres.

Les glycérolipides (GL) comprennent les triacylglycérols (TG), qui participent au stockage de l'énergie et les diacylglycérols (DG), intermédiaires de synthèses des GL et PL et seconds messagers de la signalisation cellulaire.

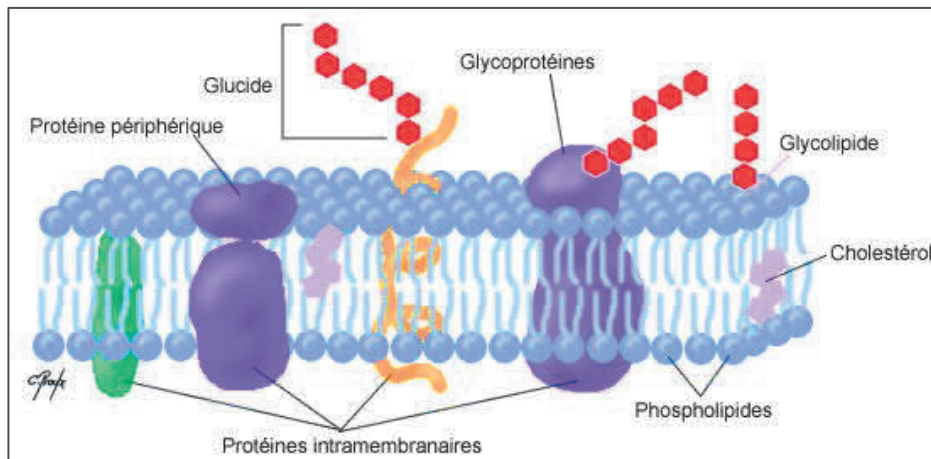


Figure 19. Constituants de la membrane cellulaire.

## II. Les acides gras chez l'hôte

### 1. Généralités

Les acides gras (AG) sont des acides carboxyliques formés d'une chaîne carbonée linéaire de longueur variable (le plus souvent entre 12 et 22 atomes de carbone) avec un nombre d'insaturation variable. La nomenclature repose sur le nombre de carbones et sur le nombre et la position des doubles liaisons. La notation la plus couramment utilisée est la suivante :  $x:y-n-z$  où  $x$  correspond au nombre d'atomes de carbones,  $y$  au nombre de doubles liaisons et  $z$  à l'emplacement de la première double liaison à partir de l'extrémité méthyle (Figure 2). Une autre nomenclature désigne le méthyle terminal par oméga au lieu de  $n$ . La nomenclature dite chimique définit les positions des insaturations à partir de l'extrémité carboxyle.

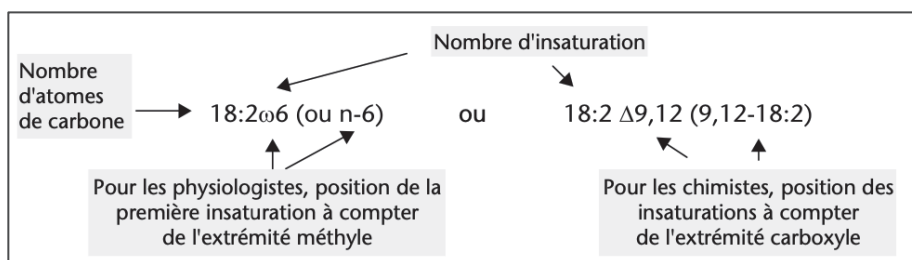
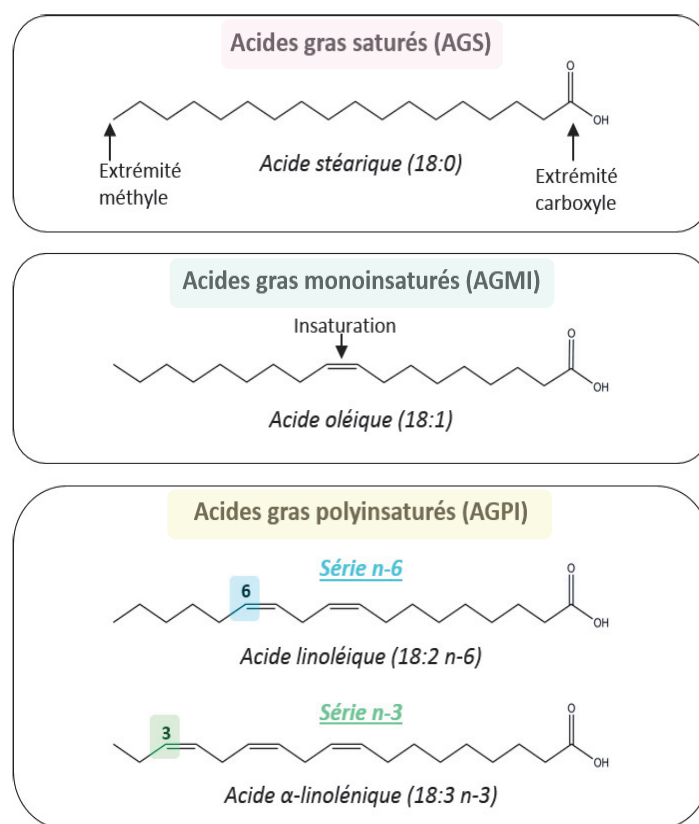


Figure 20. Nomenclature des acides gras (Guesnet et al., 2005).

Les AG sont classifiés selon leur nombre de doubles liaisons. On distingue ainsi 3 classes d'acides gras :

- Les saturés (AGS) : ils ne comportent pas de double liaison
- Les mono-insaturés (AGMI) : une double liaison
- Les polyinsaturés (AGPI) : plusieurs doubles liaisons

Les familles d'AGMI et AGPI se distinguent par la position de la première double liaison située vers l'extrémité méthyle. Ainsi, les monoinsaturés appartiennent à la famille des AG n-9 ou n-7. Les AGPI sont représentés par la famille de l'acide linoléique ou oméga 6 (n-6) et celle de l'acide  $\alpha$ -linoléique ou oméga 3 (n-3) (Figure 21).



**Figure 21.** Classification des acides gras (Guesnet et al., 2005).

Chaque acide gras possède un nom UPAC (International Union of Pure and Applied Chemists) et un nom commun. La tableau 2 présente la classification et la nomenclature des principaux acides gras.

**Tableau 2.** Classification et nomenclature des principaux acides gras.

Catégorie	Formule	Nom commun	Abréviation
<b>Saturés</b>	4 :00	Acide butyrique	
	6 :00	Acide caproïque	
	8 :00	Acide caprylique	
	10 :00	Acide caprique	
	12 :00	Acide laurique	
	14 :00	Acide myristique	MA
	16 :00	Acide palmitique	PA
	18 :00	Acide stéarique	SA
	20 :00	Acide arachidique	
	22 :00	Acide béhénique	
<b>Mono-insaturés</b>	16 :1n-7	Acide 9-cis-hexadécénoïque	
	16 :1n-9	Acide palmitoléique	
	18 :1n-7	Acide 11-cis-octadécénoïque	
	18 :1n-9	Acide oléique	OA
	20 :1n-9	Acide eicosénoïque	
<b>Poly-insaturés</b>	18 :2n-6	Acide linoléique	LA
	18 :3n-6	Acide $\gamma$ -linoléique	GLA
	18 :3n-3	Acide $\alpha$ -linoléique	ALA
	20 :2n-6	Acide eicosadiénoïque	
	20 :3n-6	Acide di-homo-gamalinoléique	
	20 :4n-6	Acide arachidonique	AA
	20 :5n-3	Acide eicosapentaénoïque	EPA
	22 :5n-3	Acide docosapentaénoïque	DPA
	22 :6n-3	Acide docosahexaénoïque	DHA

## **2. Voie de biosynthèse**

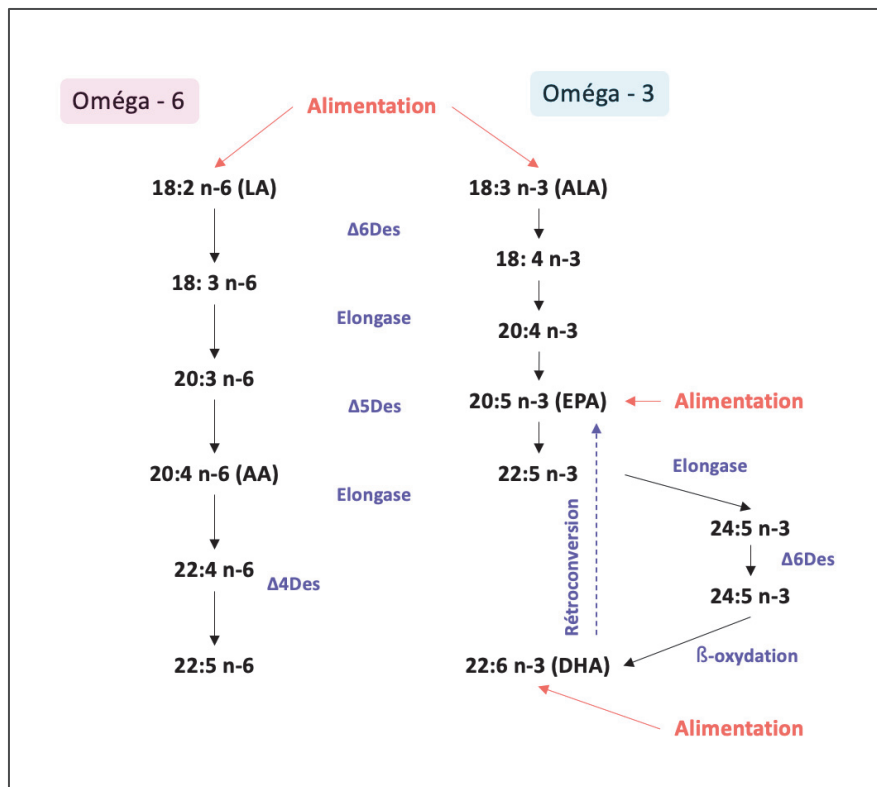
### **a. Les acides gras saturés**

La synthèse *de novo* des AG se déroule majoritairement dans les tissus lipogéniques comme le foie, le tissu adipeux, les glandes mammaires et les reins. La voie de biosynthèse des AG débute par la formation de malonyl-CoA par carboxylation de l'acétyl-CoA et la condensation ultérieure du malonyl-CoA avec l'acétyl-CoA avec libération de CO<sub>2</sub>. Chez les mammifères, les étapes de la biosynthèse impliquent un complexe protéique : la synthase d'acide gras de type I (FAS I). Les systèmes d'élongases permettent d'étendre les produits de la FAS I aux AG à plus longues chaînes.

### **b. Les acides gras insaturés**

Il existe deux types d'enzymes responsables de la formation d'un grand nombre d'acides gras à partir d'un nombre limité de précurseurs : les désaturases et les élongases. Les désaturases permettent d'ajouter une double liaison (= insaturation) entre deux carbones et les élongases permettent d'allonger la chaîne carbonée des acides gras de deux carbones. Les mammifères n'ont pas la capacité de produire les précurseurs des AGPI des familles n-3 et n-6, l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA, 18:3n-3) et l'acide linoléique (LA, 18:2n-6). Ils sont dits essentiels et seul l'alimentation permet leurs apports. Ces acides gras sont pris en charge par la machinerie enzymatique constituée de désaturases et d'élongases pour produire les différents AGPI de ces deux familles (Figure 22) (Guillou et al., 2010).

Les AGPI n-3 et n-6 sont synthétisés selon deux voies distinctes puisqu'ils ont des précurseurs différents. Cependant, les étapes de désaturations et d'élongations nécessitent les mêmes enzymes pour les deux voies ce qui peut entraîner une compétition entre celles-ci impliquant alors une « balance métabolique » entre ces deux familles. Les réactions s'effectuant depuis la partie COOH terminale, la série de l'acide gras précurseur est conservée.



**Figure 22.** Voie de biosynthèse des APGI n-6 et n-3 à longue chaîne à partir des AGPI essentiels.

L'acide linoléique (18:2 n-6) est converti en acide  $\gamma$ -linoléique (18:3 n-6) par une  $\Delta 6$  désaturase. L'acide dihomog- $\gamma$ -linoléique (20:3n-6) est issu de l'élongation de l'acide  $\gamma$ -linoléique (18:3 n-6) par élongase. Le DGLA (20:3 n-6) est substrat d'une  $\Delta 5$ désaturase ayant pour produit l'acide arachidonique (20:4 n-6) qui sous l'action d'élongase va aboutir à la formation de l'acide adrénique (22:4 n-6). Ce dernier peut être converti en 24:4 n-6 par une étape d'élongation. La désaturation du 24:4 n-6 par une  $\Delta 6$  désaturase permet la formation de 24:5 n-6.

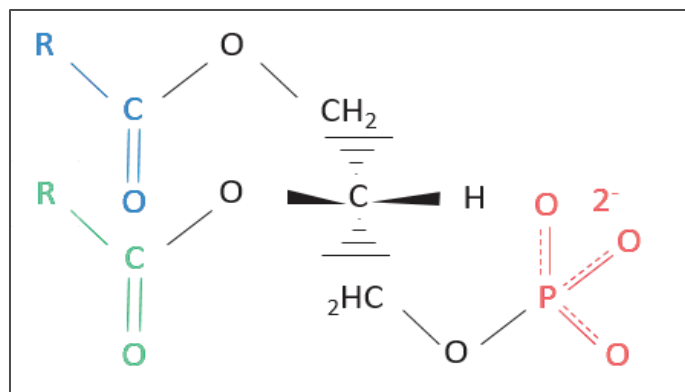
L'acide  $\alpha$  -linoléique (18:3 n-3) est converti par une  $\Delta 6$  désaturase en acide stéaridonique (18:4 n-3) qui sous l'action d'une élongase est converti en acide eicosatetraénoïque (20:4 n-3). Ce dernier peut alors être substrat d'une  $\Delta 5$  désaturase formant l'acide eicosapentaénoïque (20:5 n-3), lui-même pouvant être converti en acide docosapentaénoïque (22:5 n-3) par une élongase. Ce dernier est converti en acide tétracosapentaénoïque (24:5 n-3), qui peut alors subir une  $\Delta 6$  désaturation pour fournir l'acide tétracosahexaénoïque (24:6 n-3). Les 24:5 n-6 et 24:6 n-3 peuvent alors entrer dans la voie de  $\beta$ -oxydation peroxisomale pour fournir le 22:5 n-6 et l'acide docosahexaénoïque (22:6 n-3).

La voie de bioconversion qui conduit à la synthèse des acides arachidonique (20:4 n-6) et eicosapentaénoïque (20:5 n-3) se situe dans le réticulum endoplasmique. La synthèse du DHA (22:6 n-3) et de l'acide docosapentaénoïque (22:5 n-6) nécessite une dernière étape de  $\beta$ -oxydation dans les peroxysomes (Guesnet et al., 2005).

### 3. Distribution, captation et incorporation dans les lipides cellulaires

Les AG synthétisés par l'organisme sont retrouvés en différentes proportions dans l'organisme. L'AA et le DHA sont respectivement les AGPI les plus représentés chez les acides gras n-6 et n-3 (Salem et al., 2015).

Les AG sont retrouvés sous différentes formes dans l'organisme notamment sous forme non estérifiés (forme libre) le plus souvent liés à l'albumine, ou estérifiés dans les lipides cellulaires PL, GL et cholestérol. L'incorporation des AG dans les lipides membranaires nécessite leur activation préalablement en acétyl-CoA par une acyl-CoA synthétase. L'acyl-CoA ainsi formé est transféré par une acyltransférase au glycérol-3-phosphate pour donner l'acide phosphatidique (PA), précurseur à la synthèse *de novo* des GL et PL.



**Figure 23.** Structure de l'acide phosphatidique.

Les PL synthétisés *de novo* possèdent la même composition en acides gras que les PA précurseurs. Les PL cellulaires subissent un remodelage constant de leurs chaînes acyles par un mécanisme de dé-acylation/ré-acylation. Cette voie de remodelage des PL nécessite la libération d'un des deux acyles gras par une phospholipase qui génère un lysoPL. L'estérification d'un nouvel AG sur ce lysoPL se déroule en deux étapes. Tout d'abord, l'AG doit être activé sous forme d'acyl-CoA par une acyl-CoA synthétase. Ensuite, l'AG activé est transféré vers un lysoPL grâce à une lysoPL acyltransférase (Lands and Merkl, 1963). Il existe en outre des voies de remodelage par des réactions de transacylation entre deux PL dépendantes ou indépendantes du coenzyme A.

#### **4. Rôle structural des AGPI**

Le DHA et l'AA peuvent moduler les propriétés physiques (fluidité, dynamique et perméabilité membranaire) et chimiques (influence dans la composition des membranes et implication dans des voies de signalisation) des membranes cellulaires. En effet, ils sont des constituants majeurs des PL des membranes cellulaires. Une plus grande fluidité et perméabilité de la membrane est possible avec l'insertion d'AGPI à longue chaîne dans les PL membranaires. Les chaînes polyinsaturées estérifiées peuvent alors adopter différentes conformations d'énergies équivalentes et adapter leur conformation à la courbure de la membrane. Une étude a démontré que lorsque les cellules ont incorporé des AGPI dans les PL, la membrane plasmique est devenue plus sensible à la déformation par une force de traction et le taux d'endocytose a été augmenté notamment dans des conditions où le cholestérol est limitant. Les PL polyinsaturés adaptent leur conformation à la courbure de la membrane. Ainsi, en réduisant le coût énergétique de la flexion et de la fission des membranes, les PL polyinsaturés peuvent favoriser l'endocytose rapide (Pinot et al., 2014).

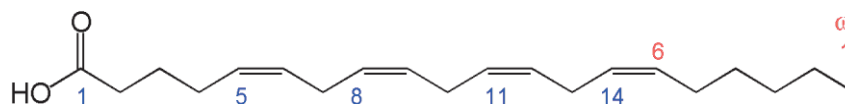
L'insertion d'AGPI dans la membrane cellulaire peut entraîner la ségrégation des domaines membranaires appelés rafts ou radeaux lipidiques (Chapkin et al., 2008). Les rafts constituent des domaines stables pour l'ancrage des protéines et des récepteurs impliqués dans la signalisation cellulaire.

#### **5. AGPI d'intérêts : l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque**

##### **a. L'acide arachidonique**

L'acide arachidonique (AA) est un acide gras de 20 chaînes de carbone avec 4 doubles liaisons cis appartenant aux AGPI oméga 6. Présent dans toutes les cellules mammifères, généralement estérifié en position 2 dans les PL membranaires, c'est l'un des AGPI les plus abondants dans les tissus humains. Il est obtenu grâce à la consommation de divers aliments tels que la volaille, le poisson, les fruits de mer et les œufs, ou par conversion de l'acide linoléique, acide gras essentiel abondant dans de nombreux aliments notamment les noix, graines grasses et leurs huiles végétales dérivées (Tallima and El Ridi, 2017). L'AA est présent dans l'ensemble des tissus et cellules, principalement sous forme estérifiée dans les PL composant les membranes cellulaires. En moyenne, il représente 10% des chaînes acyles des lipides totaux et jusqu'à 20% dans les PL où il est majoritaire parmi les autres acides gras oméga 6. L'AA est retrouvé en forte proportion dans les PE et PI.





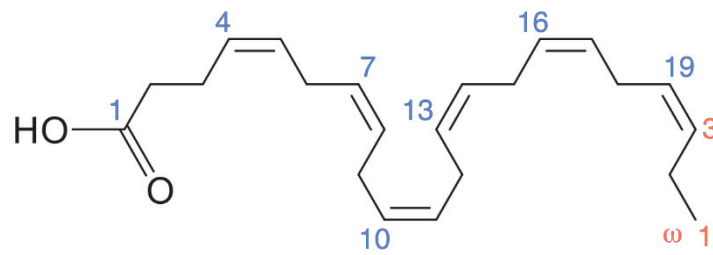
**Figure 24.** Structure de l'acide arachidonique.

Cet acide gras est important à la fois pour la fluidité de la membrane cellulaire et comme substrat pour de nombreuses transformations enzymatiques qui forment des médiateurs lipidiques biologiquement actifs tels que les prostaglandines, les leucotriènes, les dérivés hydroxylés et les endocannabinoïdes (Martin et al., 2016).

### **b. L'acide docosahexaénoïque**

L'acide docosahexaénoïque (DHA) est un acide gras de 22 chaînes de carbone avec 6 doubles liaisons cis appartenant aux AGPI oméga 3. Il est le plus long et le plus insaturé des acides gras retrouvés substantiellement dans les tissus humains. Le DHA n'est pas un acide gras essentiel puisqu'il peut être métabolisé à partir de son précurseur ALA, présent dans les huiles végétales comme l'huile de lin, de colza ou de soja. Toutefois, le taux de conversion de ALA en DHA est faible chez l'homme, inférieur à 1% (Burdge and Calder, 2005). L'alimentation reste donc la principale source de DHA, abondant dans les fruits de mer, les algues et les poissons gras (saumon, maquereau, hareng, thon, anchois, sardines).

Le DHA est retrouvé dans tous les tissus et types cellulaires chez les mammifères cependant il représente moins de 5% des chaînes acyles des PL, à l'exception des PL des cellules neuronales de la rétine et des spermatozoïdes, où il peut représenter jusqu'à 50% des acides gras totaux. Il n'est pas réparti de manière homogène parmi les différentes classes de PL. Les PE et les PS sont plus riches en DHA que les PC (Glomset, 2006). Le BMP est également riche en DHA (voir IV). Le DHA exogène s'incorpore également préférentiellement dans ces phospholipides. Tout comme l'AA, il est préférentiellement estérifié en position sn-2 des phospholipides.



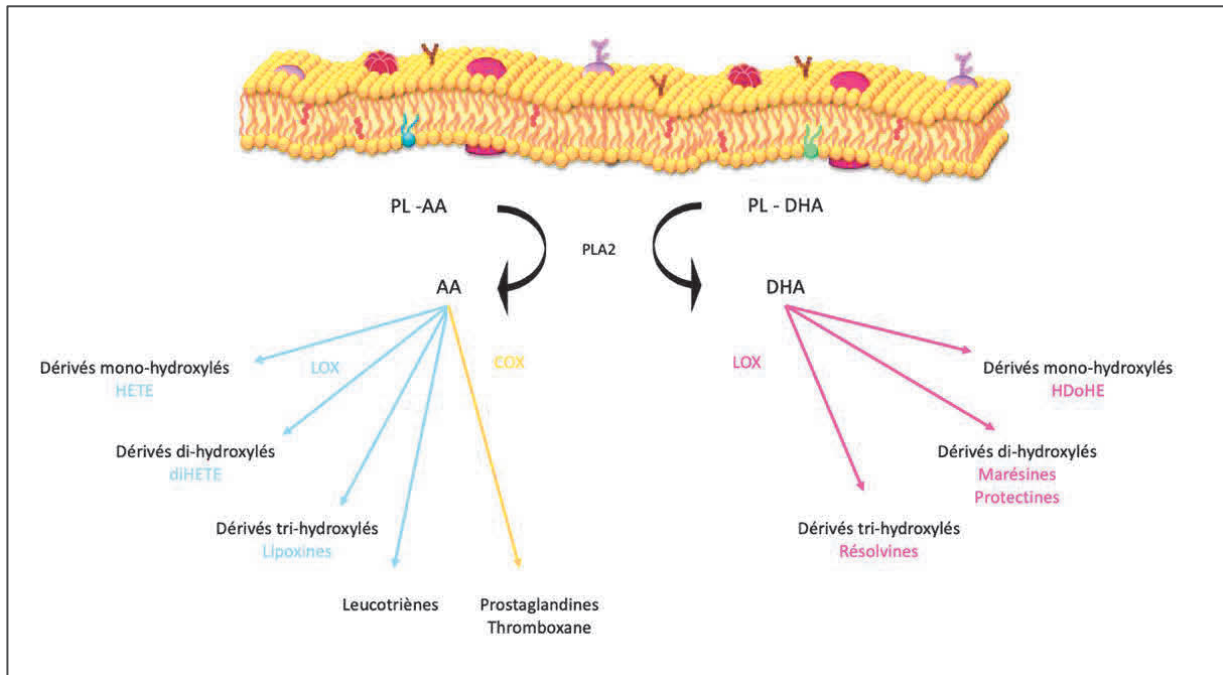
**Figure 25.** Structure du DHA.

Le DHA exerce de nombreux rôles physiologiques tels que la régulation de la fluidité membranaire et la myélinisation. Afin de déterminer la structure et la conformation du DHA, estérifié dans les PL membranaires, de nombreuses études ont été menées. Ainsi grâce à la résonance magnétique nucléaire (RMN), la diffraction à rayon-X et la modélisation moléculaire, il a été démontré que les six doubles liaisons cis non conjuguées confèrent une très grande flexibilité du DHA comparé au AGS (Gawrisch and Soubias, 2008).

Le DHA joue également un rôle majeur dans l'acuité visuelle et le développement cérébral ainsi que dans plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Il est aussi reconnu pour ses effets protecteurs contre les maladies cardiovasculaires, l'amélioration de la stéatose hépatique non alcoolique ou la réduction de l'hypertriglycéridémie. Il exerce des effets anti-inflammatoires et hypolipémiants, notamment avec la formation de dérivés hydroxylés comme les protectines et résolvines (Kuda, 2017).

## 6. Métabolisme oxygéné de l'AA et du DHA

L'AA et le DHA sont des précurseurs de différents métabolites oxygénés, tels que les eicosanoïdes et les docosanoïdes. Deux étapes sont nécessaires à la synthèse de ces molécules : la libération des AGPI précurseurs à partir des phospholipases, et leur transformation en dérivés oxygénés via deux voies principales : la voie des lipoxygénases et la voie des cyclooxygénases.

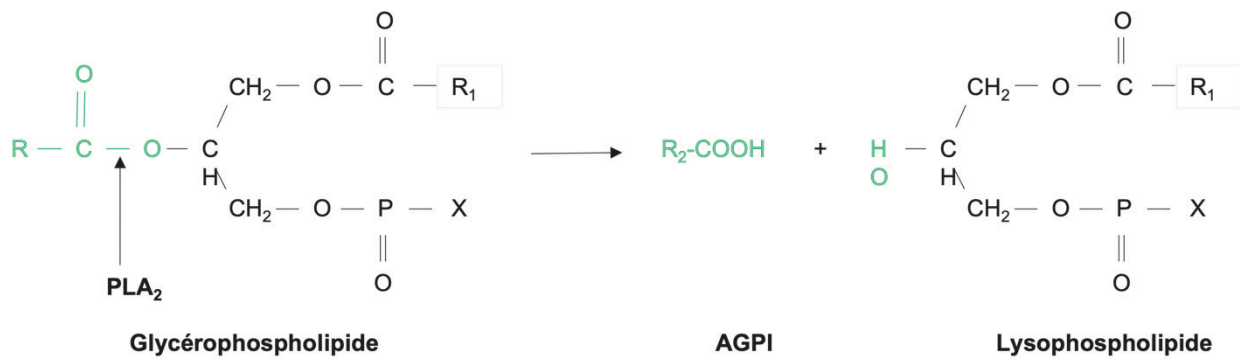


**Figure 26.** Voie de synthèse de certains métabolites oxygénés dérivés de l'AA et du DHA.

### a. Les phospholipases

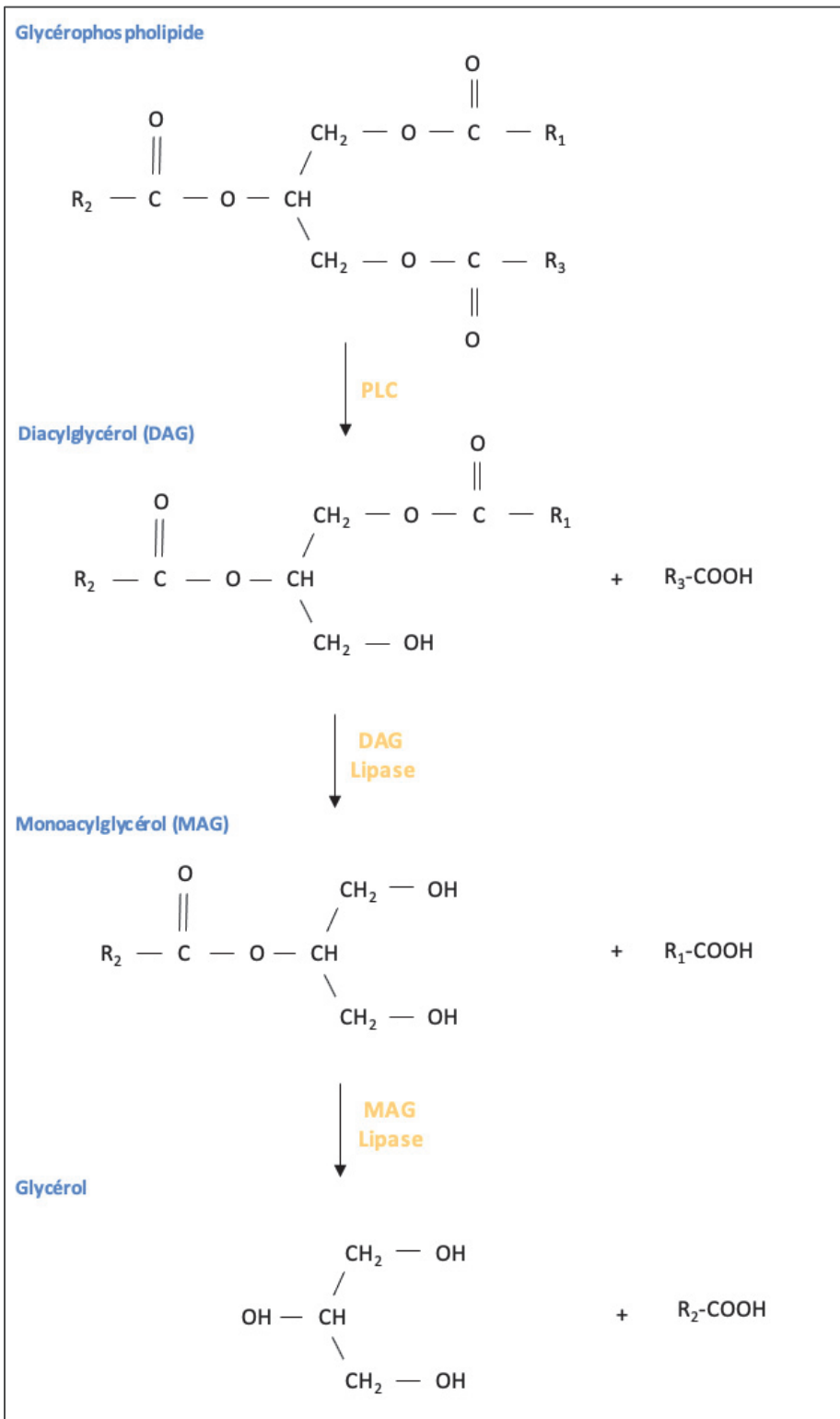
Les phospholipases sont contenues dans la plupart des cellules et existent sous plusieurs formes : excrétée, associée à une membrane, ou intracellulaire. Il existe quatre classes de phospholipases classées selon leur site de clivage sur les PL : les phospholipases A, B, C et D (Aloulou et al., 2018). Chacune de celles-ci possède une spécificité de substrat selon les types de lipides, la classe de PL et le type d'AGPI estérifiés dans les PL.

Les phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) jouent un rôle majeur dans la libération des AGPI à partir des PL. Elles hydrolysent la liaison ester des PL membranaires en sn-2 (Figure 27). Le DHA est plutôt libéré par l'iPLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> indépendante du calcium) tandis que l'AA est principalement libéré par la cPLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> cytosolique) (Strokin et al., 2003).



**Figure 27.** Libération des AGPI à partir des glycérophospholipides par action de la phospholipase A2.

Les PLC permettent aussi de libérer des acides gras dont des AGPI en association avec les DAG et MAG lipases. Elles hydrolysent les PL pour former des DAG qui sont hydrolysés par une DG lipase, libérant un AG et formant un MAG ; le MAG est ensuite hydrolysé par la MAG lipase en glycérol et AG (Authi et al., 1985) (Figure 28).



**Figure 28.** Libération des acides gras par les phospholipases C.

## **b. Les lipoxygénases**

Les lipoxygénases (LOX) sont impliquées dans la synthèse de plusieurs médiateurs lipidiques bioactifs tels que les leucotriènes, les lipoxines, les résolvines et les protectines. Ces enzymes contenant du fer non-héminique catalysent l'insertion d'oxygène moléculaire dans les AGPI contenant au moins deux doubles liaisons *cis* formant un motif 1,4-*cis-cis*-pentadiène (Andreou and Feussner, 2009). Cette oxygénation s'effectue en quatre réactions successives pour former un hydroperoxyde d'acide gras qui est ensuite réduit par le glutathion peroxydase en acide gras monohydroxylé. Les LOX convertissent les AG sous forme libre mais aussi les acides gras estérifiés dans les PL (Hammond and O'Donnell, 2012; O'Connor Butler et al., 2010).

Ces enzymes existent sous plusieurs formes chez les mammifères, issues de différents gènes ALOX. La 15-LOX existe sous deux isoformes : la 15-LOX1 principalement exprimée dans les éosinophiles, les réticulocytes et les cellules endothéliales vasculaires et la 15-LOX2 présente dans les cellules épithéliales. Ces 15-LOX sont impliquées dans la régulation de la pression sanguine et de l'hypertension ainsi que dans la régulation de la carcinogenèse (Chawengsub et al., 2009). La 12-LOX est fortement exprimée dans les plaquettes. La 5-LOX, l'enzyme initiale dans la synthèse des leucotriènes, est impliquée dans la régulation de l'inflammation (Chawengsub et al., 2009). Elle est retrouvée dans les leucocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Rådmark and Samuelsson, 2010).

## **c. Les cyclooxygénases**

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes liées à la membrane jouant un rôle primordial dans la cascade d'inflammation. Ces enzymes agissent principalement sur l'AA pour former des dérivés oxygénés nommés prostanoides. Ce sont des enzymes bifonctionnelles possédant deux sites catalytiques. La première possède une activité cyclooxygénase, ajoutant des molécules d'oxygène sur l'AA afin de former un endoperoxyde : la prostaglandine G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>). Le deuxième site catalytique possède une activité peroxydase permettant de réduire la PGG<sub>2</sub> en prostaglandine H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>).

Il existe trois isoformes de COX : la COX-1, la COX-2 et la COX-3. COX-1 est exprimé dans les cellules endothéliales vasculaires, les plaquettes sanguines, les cellules endothéliales vasculaires ainsi que dans l'estomac et les reins. COX-2 est induite par des stimuli inflammatoires, des hormones et facteurs de croissance. Elle est exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires et rénales ainsi qu'au niveau du système nerveux central. COX-3 est un isoforme de COX-1, différant de COX-1 par l'absence d'un intron. Elle est présente dans le cerveau, et semble impliquée dans les processus inflammatoires (Chandrasekharan et al., 2002).

## **7. Métabolisme oxygéné de l'acide arachidonique**

L'AA peut être converti en différentes classes de métabolites oxygénés suite à l'action des LOX ou des COX (Figure 29).

### **a. Les acides gras mono-hydroxylés**

Les acides gras mono-hydroxylés sont des métabolites obtenus par oxygénation de l'AA par la 15-LOX, 12-LOX et 5-LOX. La première étape, catalysée par les LOX implique l'abstraction d'un atome d'hydrogène suivi de l'ajout d'un oxygène afin de former des hydroperoxydes : acide hydroperoxyeicosatétraénoïque (HpETE) : 15(S)-HpETE, 12(S)-HpETE et le 5(S)-HpETE. (Figure 9). Ces intermédiaires peuvent aussi être formés de manière non enzymatique via la peroxydation lipidique. Ensuite ces hydroperoxydes sont réduits par le glutathion peroxydase 1 (GPx-1) en acides gras hydroxylés HETE= acide hydroxyeicosatétraénoïque correspondant : 15(S)-HETE, 12(S)-HETE et le 5(S)-HETE (Yamamoto, 1992) (Figure 29).

Les mono-hydroxylés dérivés de l'AA exercent principalement des effets régulateurs de l'inflammation. Les HETEs sont généralement décrits comme des chémo-attractants ; Le 15-(S)-HpETE présente des propriétés anti-inflammatoires dans plusieurs modèles d'inflammation (Kühn, 1996).

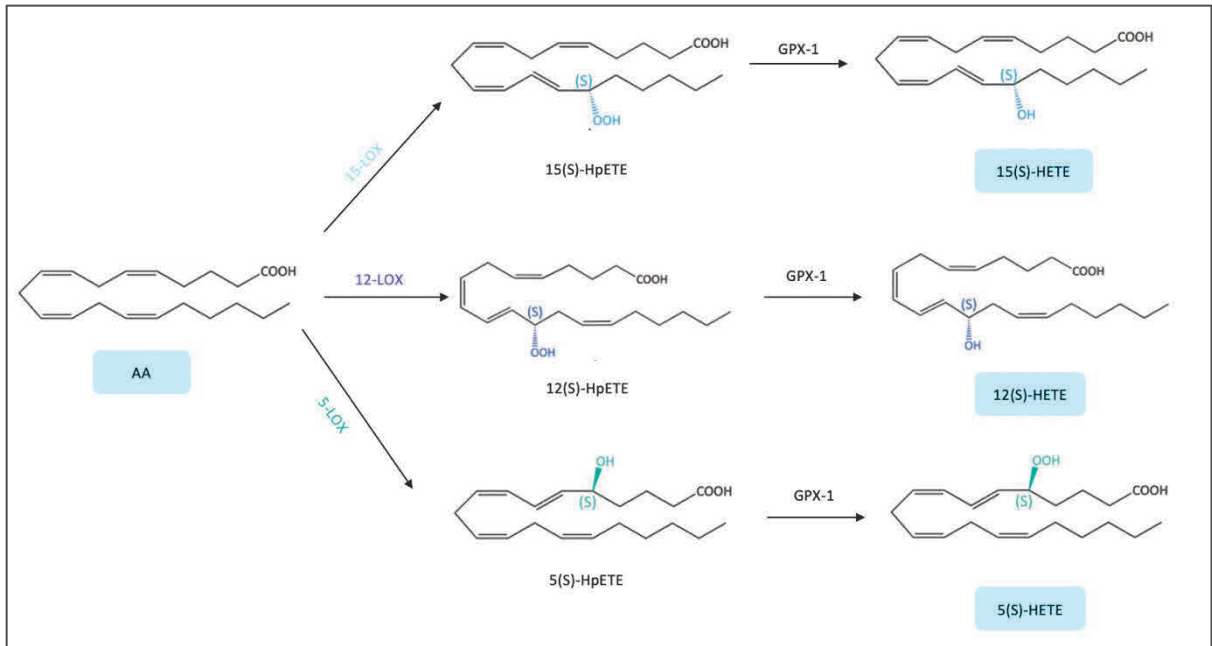


Figure 29. Métabolites mono-hydroxylés à partir de l'AA.

### b. Les leucotriènes

La première étape de la biosynthèse des leucotriènes (LT), catalysée par la 5-LOX, implique la formation de 5(S)-HpETE. La deuxième étape consiste en l'élimination d'un atome d'hydrogène du C10 conduisant à la formation d'un époxyde : le leucotriène A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), précurseur des autres LT (Williams and Higgs, 1988) (Figure 30).

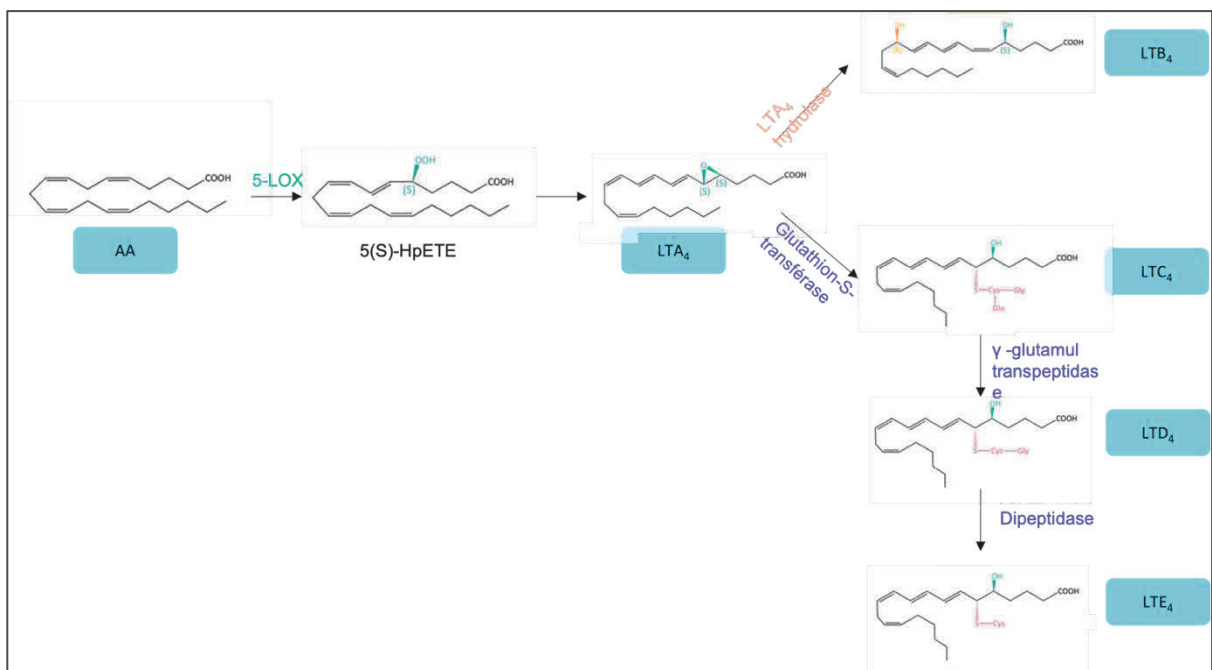


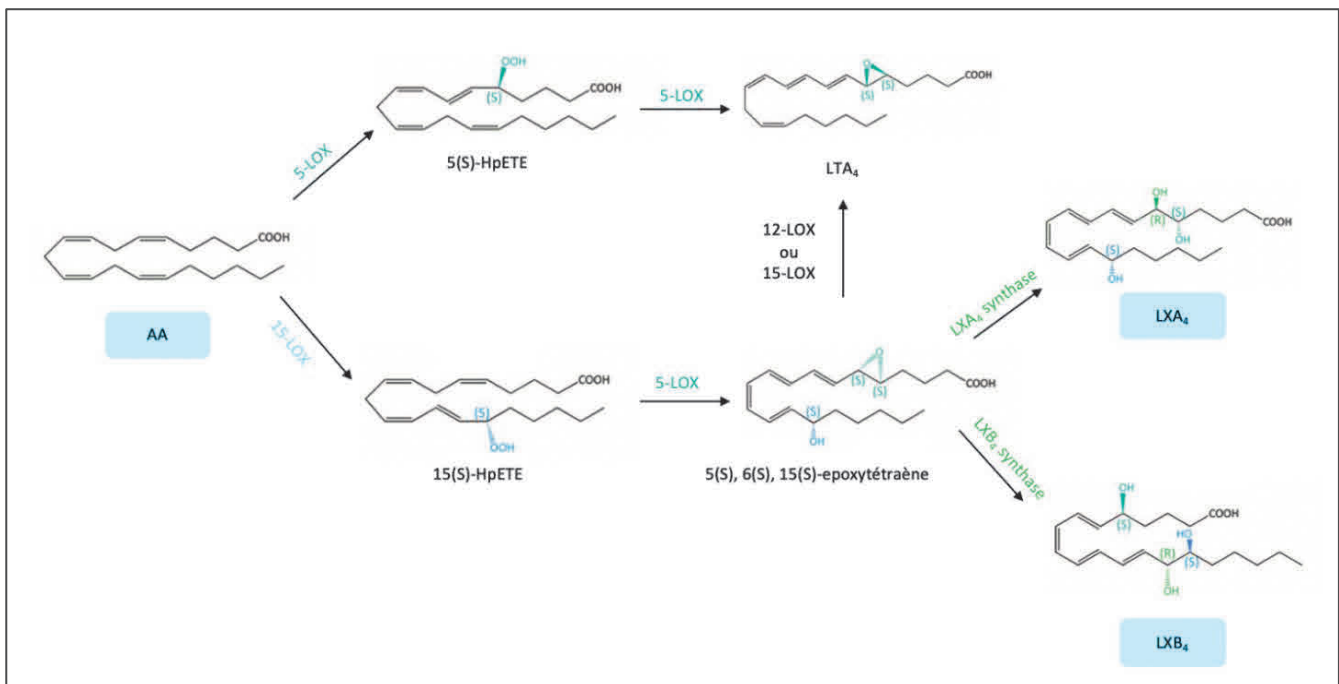
Figure 30. Voie de synthèse des leucotriènes à partir de l'AA.



Les LT sont générés au site d'infection ou d'inflammation principalement par les cellules inflammatoires y compris les PMN (polymorphonucléaires), les macrophages et les mastocytes. Ils agissent comme des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires. Le LTB<sub>4</sub> active et attire les neutrophiles, macrophages et lymphocytes tandis que le LTD<sub>4</sub> est un chimioattracteur des éosinophiles.

### c. Les lipoxines

Les lipoxines (LX) sont des acides gras tri-hydroxylés dérivés de l'AA possédant quatre doubles liaisons conjuguées. La synthèse des LX implique l'activité 15-LOX pour former le 15-HpETE, qui est converti par la 5-LOX en un intermédiaire lui-même converti en LXA<sub>4</sub> et LXB<sub>4</sub> par des LX synthases spécifiques (Figure 31).



**Figure 31.** Voie de synthèse des lipoxines à partir de l'AA.

La lipoxine A<sub>4</sub> est considérée comme un important médiateur lipidique anti-inflammatoire connu comme le « signal d'arrêt » dans les réactions inflammatoires.

#### d. Les prostanoïdes

- Les prostaglandines

Les prostaglandines (PG), présentes dans la plupart des tissus et organes, sont des médiateurs lipidiques agissant entre autres sur les plaquettes sanguines, l'endothélium, l'utérus et les mastocytes (Ricciotti and FitzGerald, 2011). Quatre prostaglandines bioactives peuvent être générés à partir de la  $\text{PGH}_2$  via l'action d'isomérase et de prostaglandines synthases spécifiques : la prostaglandine D2 ( $\text{PGD}_2$ ), E2 ( $\text{PGE}_2$ ),  $\text{F}_2\alpha$  ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ ) et I2 ( $\text{PGI}_2$ ) (Figure 32).

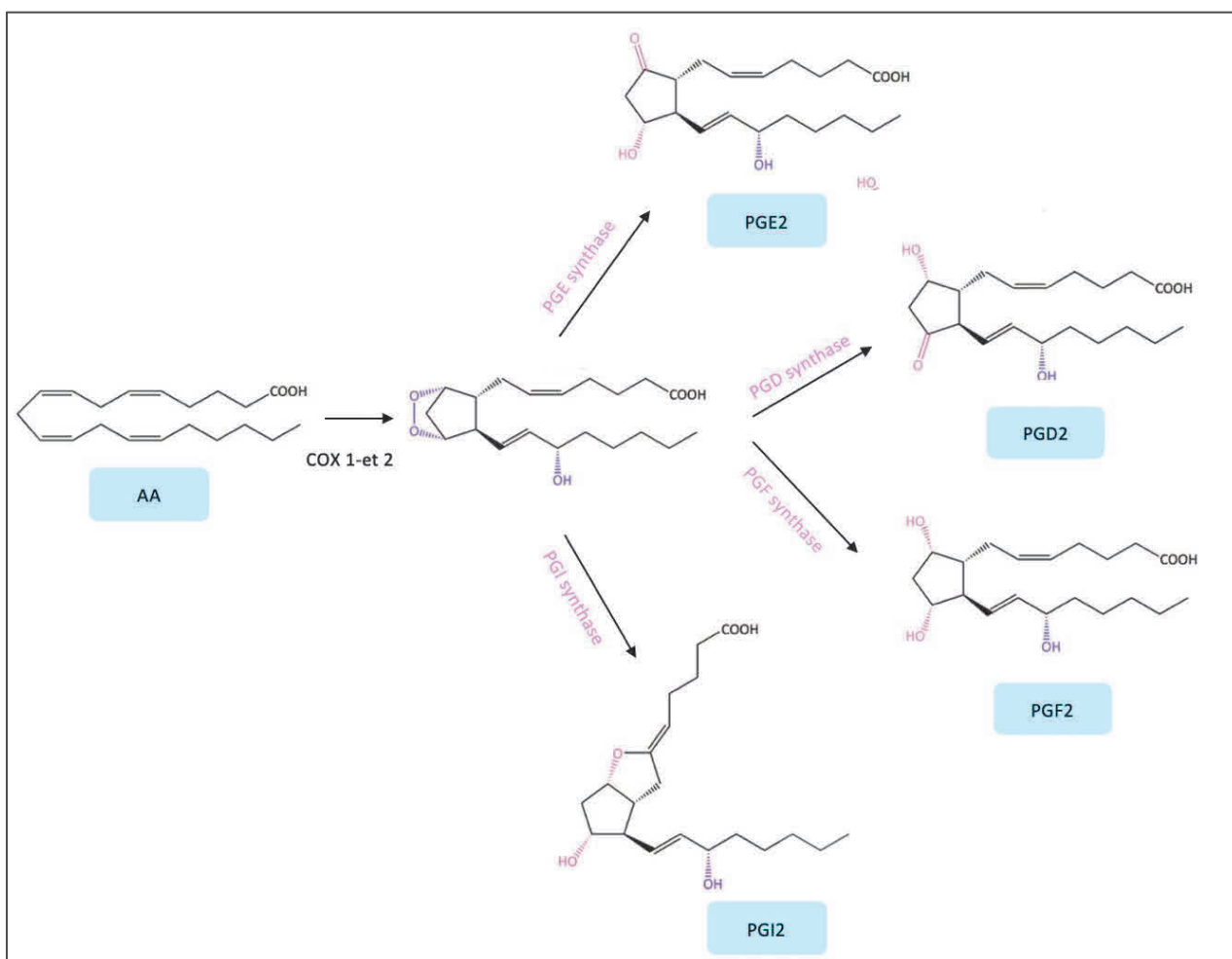
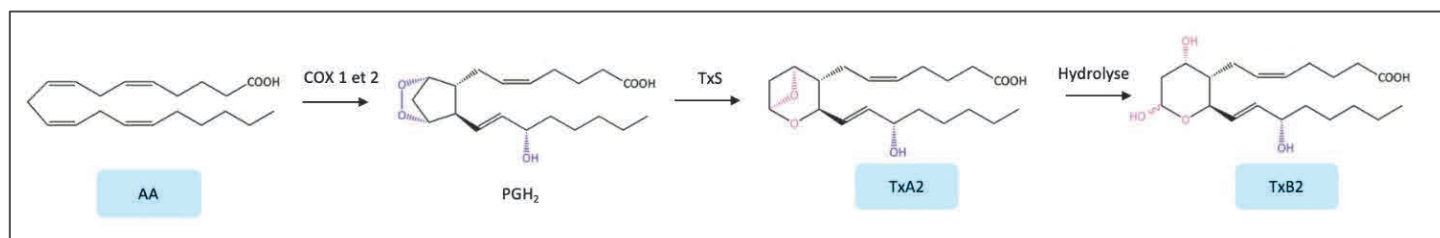


Figure 32. Voie de synthèse des prostaglandines à partir de l'AA.

La  $\text{PGE}_2$  est connue pour influencer plusieurs phénomènes clés qui déterminent le caractère de la réponse immunitaire. Elle peut altérer la capacité microbicide des macrophages. La  $\text{PGE}_2$  et  $\text{PGI}_2$  sont aussi connues pour leurs effets vasodilatateurs.

- **Les thromboxanes**

Alternativement à la voie des prostaglandines, la  $\text{PGH}_2$  est convertie en thromboxane A<sub>2</sub> ( $\text{TxA}_2$ ) via l'action de la thromboxane synthétase (Figure 33). Dans des conditions physiologiques, la  $\text{TxA}_2$  est très instable et se décompose rapidement en thromboxane B<sub>2</sub> ( $\text{TxB}_2$ ) (Christie and Harwood, 2020).



**Figure 33.** Voie de synthèse des thromboxanes à partir de l'AA.

Le  $\text{TxA}_2$  est produit par les plaquettes activées et est doté de propriétés pro-thrombiques. Ce médiateur joue un rôle important dans diverses maladies cardiovasculaires notamment par son action activatrice sur l'agrégation plaquettaire et la vasoconstriction (Helgadóttir et al., 2019).

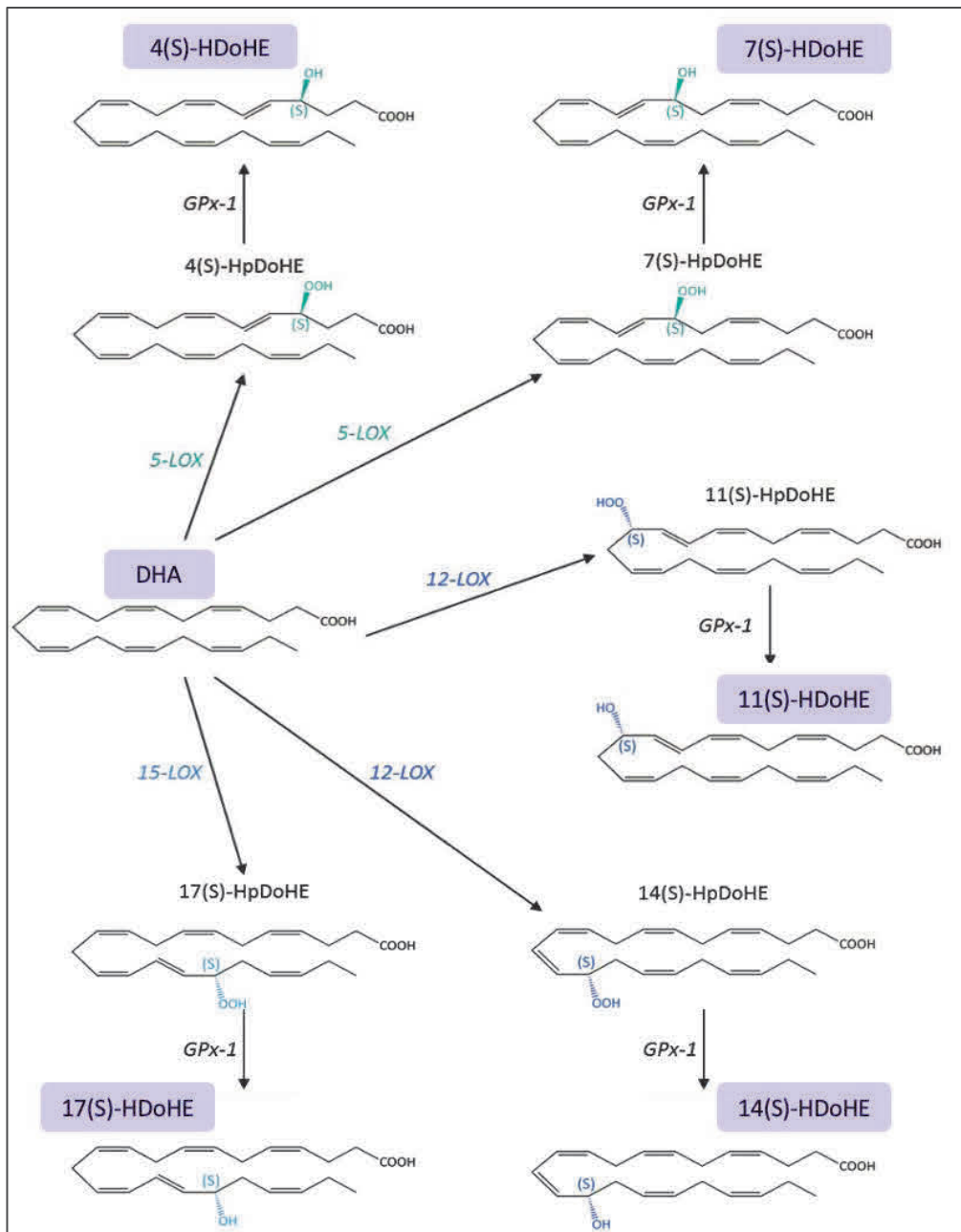
## 8. Métabolisme oxygéné de l'acide docosahéaénoïque

Le DHA peut être converti en différentes classes de métabolites oxygénés (Figure 26) suite à l'action des LOX.

### a. Les acides gras mono-hydroxylés

Le DHA peut être métabolisé par les LOX et donner différents métabolites oxygénés tels que l'acide 4-hydroxydocosahéaénoïque (4-HdoHE) et le 7-HdoHE catalysés par 5-LOX, le 11-HdoHE et le 14-HdoHE catalysés par la 12-LOX, et 17-HdoHE catalysé par 15-LOX. Les LOX permettent la formation de dérivés intermédiaires (S)-HpDoHE (acide hydroperoxydocosahéaénoïque), convertis en dérivés (S)HdoHE par une GPx (Figure 34).

Les acides gras mono-hydroxylés issus du DHA sont les précurseurs de molécules spécialisées dans la résolution des phénomènes inflammatoires, regroupées sous le terme SPM (specialized pro-resolving mediators) qui comprennent les lipoxines (LX), les résolvines (Rv), les protectines (PD) et les marésines (MaR) (Recchiuti and Serhan, 2012).

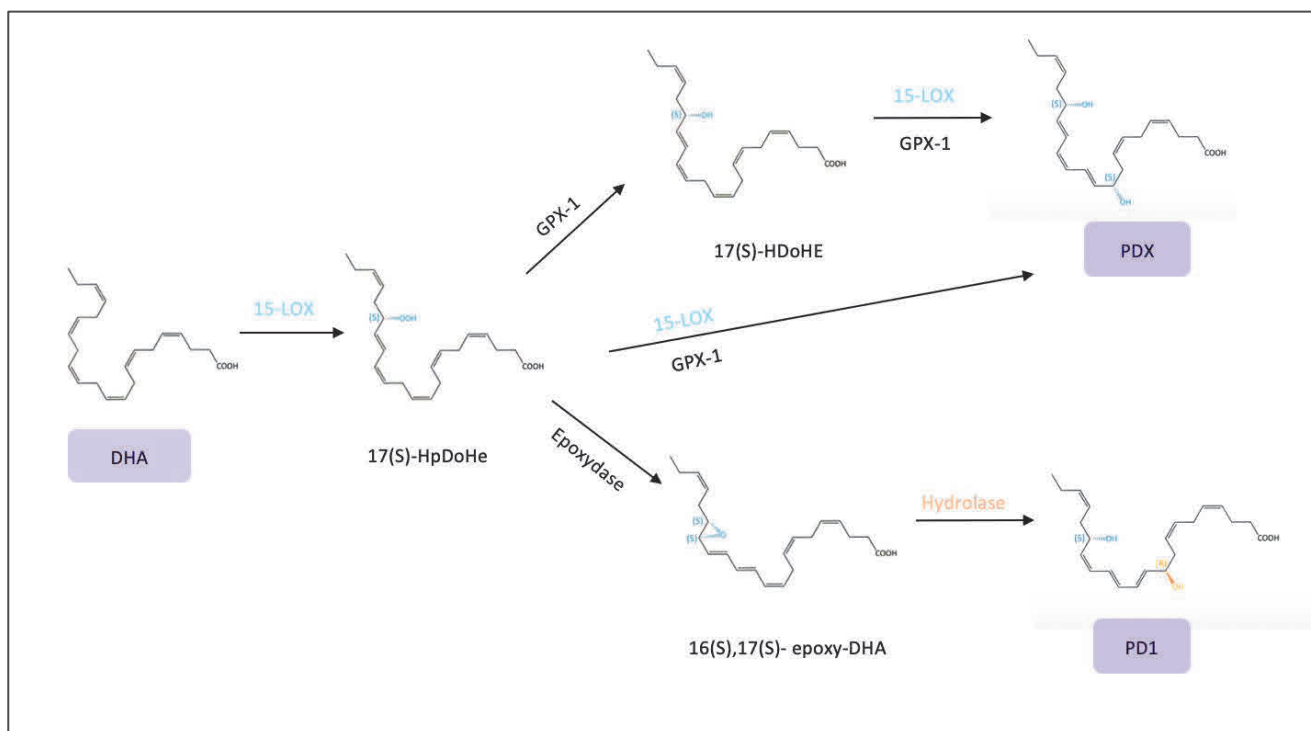


**Figure 34.** Voie de synthèse des AG monohydroxylés à partir du DHA.

## b. Les SPM

- **Les protectines**

Les protectines sont issues de l'activité 15-LOX. Le 17(S)-HpDoHE formé est converti en intermédiaire époxyde puis hydrolysé en Protectine D1 (PD1), ou converti en PDX suite à l'action d'une GPX1 et de la 15-LOX (Figure 35) (Christie and Harwood, 2020).

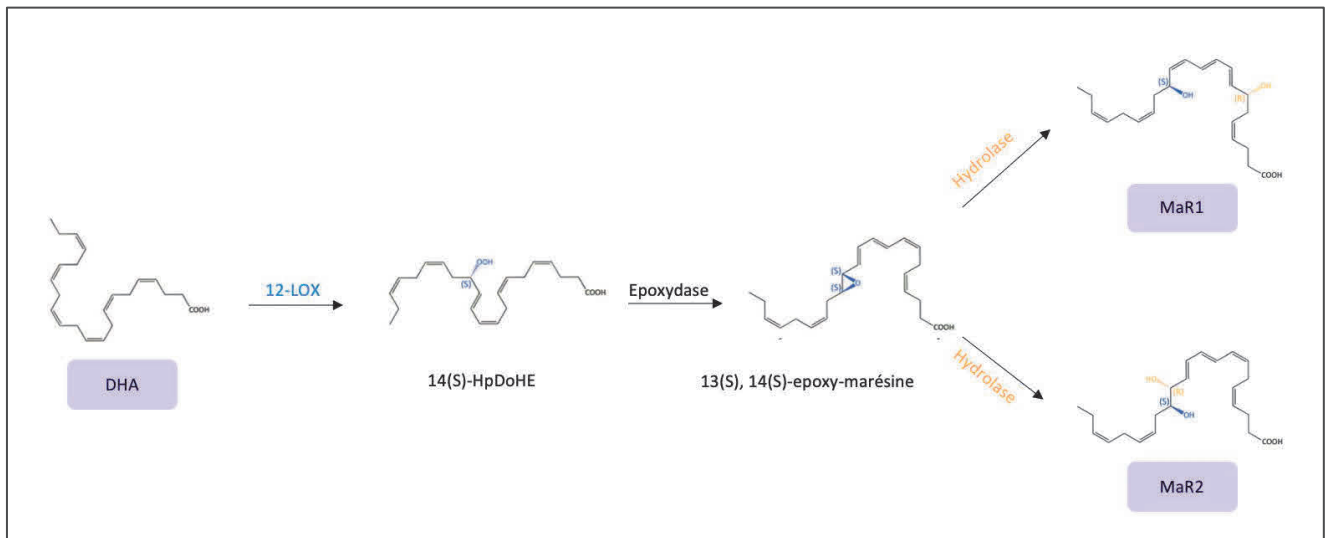


**Figure 35.** Synthèse des protectines à partir du DHA via la 15-LOX.

PD1 est synthétisée par les cellules microgliales, les cellules mononucléaires du sang périphérique et les cellules T CD4 +. Elle exerce de puissants effets immunorégulateurs notamment l'inhibition de la migration des neutrophiles et l'activation médiée par les récepteurs Toll, la suppression des cytokines inflammatoires et des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires. *In vivo*, PD1 bloque la migration des cellules T et favorise leur apoptose.

- **Les marésines**

Les marésines sont issues de l'action successive de la 12-LOX, d'une époxydase et d'hydrolases (Figure 36). La marésine 1 (MaR1) est un puissant médiateur lipidique généré par les macrophages. Elle présente des actions anti-inflammatoires et pro-résolvantes inhibant l'infiltration des neutrophiles et stimulant la phagocytose des macrophages. Son précurseur 13(S), 14(S)-epoxy-marésine présente aussi des actions anti-inflammatoires et pro-résolvantes (Serhan et al., 2012). Des études plus récentes ont mis en évidence la marésine 2 dans les macrophages (Deng et al., 2014).

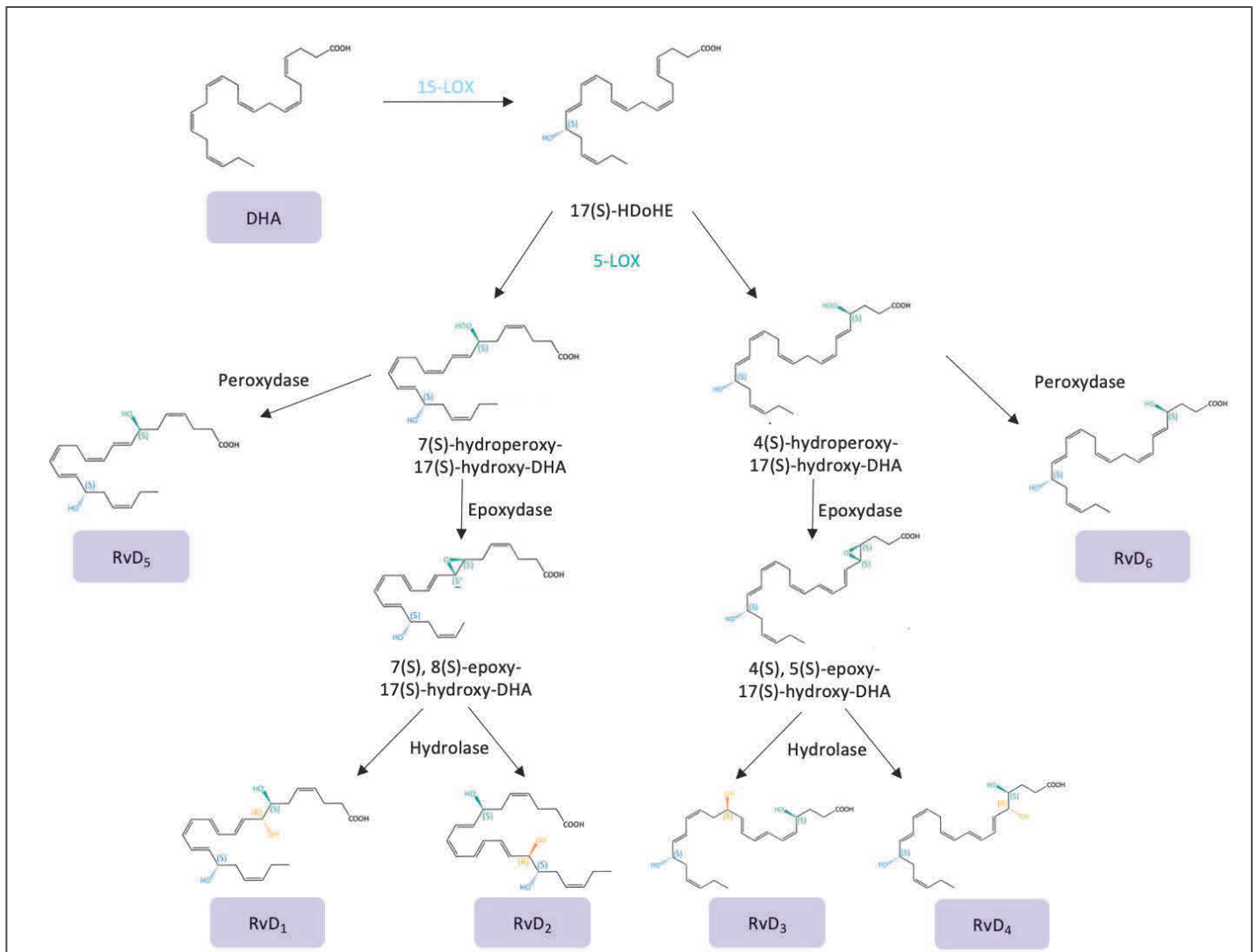


**Figure 36.** Synthèse des marésine à partir du DHA via la 12-LOX.

- **Les résolvines (RvDs)**

Les résolvines sont synthétisées par une voie impliquant la 15-LOX et la 5-LOX. La 15-LOX en association avec la GPx-1 convertit le DHA en 17(S)-HdoHE, qui est ensuite transformé par la 5-LOX en dérivés hydroperoxydes-hydroxydes, intermédiaires pour la synthèse des résolvines de type D, au nombre de 6 (Figure 37).

Les résolvines de la série D comprennent 4 composés bioactifs : RvD1, RvD2, RvD 3 et RvD4 (Bennett and Gilroy, 2016). RvD1 et RvD2 ont des propriétés anti-inflammatoires et de prérésolution en bloquant l'infiltration des neutrophiles tout en augmentant la phagocytose de macrophages des PMN apoptotiques (Bennett and Gilroy, 2016).



**Figure 37.** Synthèse des marésines à partir du DHA via la 15-LOX.

## 9. Rôle des métabolites oxygénés chez l'hôte

Des études ont mis en évidence le rôle de la PGE<sub>2</sub> dans la leishmaniose. Dans la rate des souris infectées par *L. major*, des niveaux élevés de PGE<sub>2</sub> ont été observés. Cette augmentation induit une diminution des cytokines Th1 : TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  et une augmentation des cytokines Th2 telle que l'IL-4. Dans les souris BALB/c infectées par *L. major*, la PGE<sub>2</sub> affecte aussi le rôle des cellules B-1. Ces cellules modulent l'activité phagocytaire des macrophages. La PGE<sub>2</sub> permet d'augmenter l'activité phagocytaire via la production d'IL-10 et altère donc la capacité des souris à résister à l'infection (Arcanjo et al., 2017). En revanche, dans les modèles murins d'infection à *L. amazonensis*, des niveaux élevés de LTB<sub>4</sub> et de PGE<sub>2</sub> améliorent la destruction des parasites par les macrophages notamment avec l'augmentation de la production de NO et la réduction d'IL-10 (Guimarães et al., 2006).

Une autre étude a démontré la synthèse de PGE2 et LTB4 dans les macrophages infectés par *L. donovani*. L'interaction du parasite avec le récepteur TLR2 dans les macrophages induit l'activation de la PLA2 cytosolique et libère l'AA des membranes. Cette augmentation de la PGE2 induit une cascade de messagers permettant la libération d'IL-10 et de TGF- $\beta$  et par ailleurs, la diminution des cytokines inflammatoires tels que l'IL-12, IL-17 et le TNF- $\alpha$  altérant la réponse immunitaire contre le parasite. Tandis que l'infection à *L. infantum* induit la libération de TNF- $\alpha$ , IL-12 et PGE2. La PGE2 induit la production de NO provoquant la destruction des parasites (López-Muñoz et al., 2018).

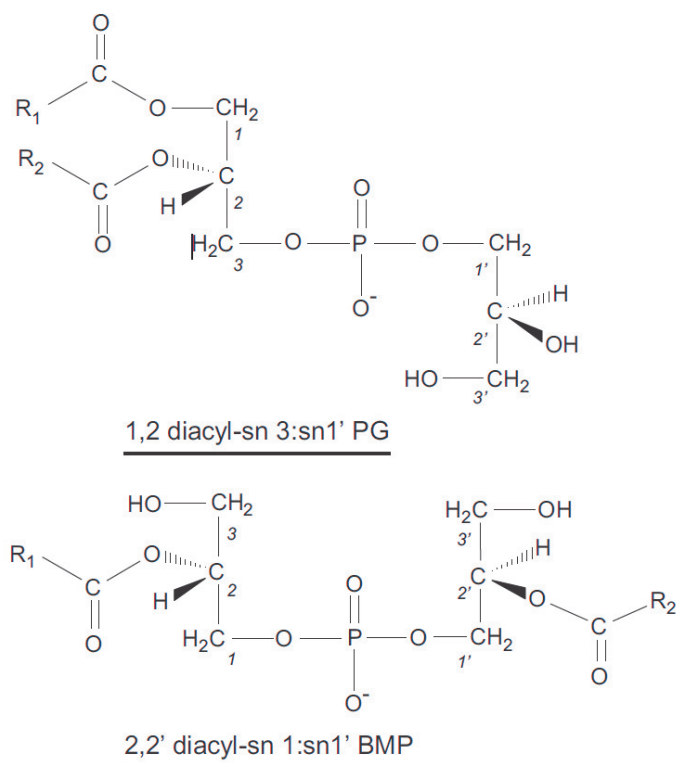
### III. Le BMP

Le bis(monoacylglycéro)phosphate, aussi connu sous le nom d'acide lysobisphosphatidique (LBPA) a été isolé pour la première fois dans le poumon de porc en 1967. C'est un glycérophospholipide chargé négativement caractérisé par sa structure inhabituelle et par sa localisation très spécifique (Akgoc et al., 2015; Showalter et al., 2020).

#### 1. Structure

Le BMP est un isomère structurel du phosphatidylglycérol (PG) avec une structure unique chez les eucaryotes supérieurs (Figure 44). Le BMP a une configuration structurelle inhabituelle sn-1, sn-1' qui n'est pas observée dans d'autres glycérophospholipides (Akgoc et al., 2015). Il est constitué de 2 molécules de glycérol reliées entre elles par un groupement phosphate. Les liaisons phosphodiesters sont en position sn-1 du premier glycérol et sn1' du deuxième glycérol. Chacun de ces glycérols est estérifié par un acide gras. Le PG quant à lui, est composé de deux molécules de glycérol reliées entre elles par un groupement phosphate. Les liaisons phosphodiesters sont en positions sn-3 du premier glycérol et sn-1' du deuxième glycérol et les deux acides gras du PG sont estérifiés sur le premier glycérol en position sn-2 et sn-3.





**Figure 38.** Structure du BMP et du phosphatidylglycérol (Hullin-Matsuda et al., 2009).

## 2. La composition en acides gras du BMP

Différentes compositions d'acides gras ont été décrites pour le BMP (Bouvier et al., 2009; Luquain et al., 2000; Showalter et al., 2020). La composition en acides gras du BMP est caractérisée par une grande proportion en acide oléique (18 :1 n-9) dans les macrophages alvéolaires pulmonaires (Mason et al., 1972) comme dans les cellules en cultures telles que les cellules BHK (baby hamster kidney) (Brotherus et al., 1974) les macrophages THP-1 (Besson et al., 2006) ou RAW (Bouvier et al., 2009). Dans de nombreux tissus, on peut détecter une importante proportion de BMP riche en DHA (22 :6 n-3) notamment dans les cellules stromales utérines de rat et humain, les cellules PC12, mais aussi dans les macrophages THP-1 et RAW (Besson et al., 2006) et dans le foie de rat et humain. En revanche, dans les macrophages alvéolaires pulmonaires, le BMP est riche en acide linoléique (18 :2) et en acide arachidonique (20 :4), mais ne contient que des traces de DHA (Cochran et al., 1987). Outre sa richesse endogène en DHA, le BMP est très avide vis-à-vis du DHA exogène.

Des études *in vitro* sur différents types cellulaires (cellules BHK, macrophages THP1, RAW) mesurant l'incorporation d'AG radiomarqués ajoutés dans le milieu de culture ont démontré une incorporation efficace du DHA dans le BMP en comparaison à d'autres AG tels que l'acide oléique (OA) et l'AA (Bouvier et al., 2009; Luquain et al., 2000).

### 3. Métabolisme du BMP

#### a. Synthèse

Malgré de nombreuses études, la voie de biosynthèse complète du BMP n'est pas entièrement comprise, en particulier le mécanisme enzymatique conduisant à la stéréoconversion inhabituelle sn-1 :sn-1' du squelette glycérol (Thornburg et al., 1991). Les premières études ont montré que le BMP peut être synthétisé à partir de glycérophospholipides exogènes, principalement le PG et la cardiolipine *in vitro* ainsi qu'*in vivo*. Des travaux plus récents ont démontré que le PG est le précurseur endogène de la biosynthèse de novo de BMP. Les cellules peuvent utiliser soit un PG endogène produit dans les mitochondries, soit du PG exogène capté à partir du milieu extracellulaire (Hullin-Matsuda et al., 2007).

Une voie de synthèse du BMP a été proposée par Waite & al (Amidon et al., 1996) (Figure 39). Selon ce schéma encore hypothétique, la première étape nécessite l'hydrolyse du PG par une PLA2 (ou PLA1 si migration de l'acide gras), formant du sn-3 :sn-1' lysophosphatidylglycérol (LPG). Ce LPG est converti en un intermédiaire, le sn-3 :sn-1' PG/BMP avec un acide gras estérifié par glycérol en position sn-1 et sn-2' par une réaction de transacylation (TA). Ensuite, un réarrangement structurel se fait spontanément, ou un complexe enzymatique de réorientation non identifié permet l'inversion de la stéréoconfiguration de la liaison phosphodiester. De plus en libérant un des acides gras en sn-1, le sn-3 :sn-1' PG/BMP devient un sn-1 :sn-1' LPG. Enfin une transacylase permet l'estérification d'un acide gras sur le sn-2 qui devient le sn1 :sn1' BMP.

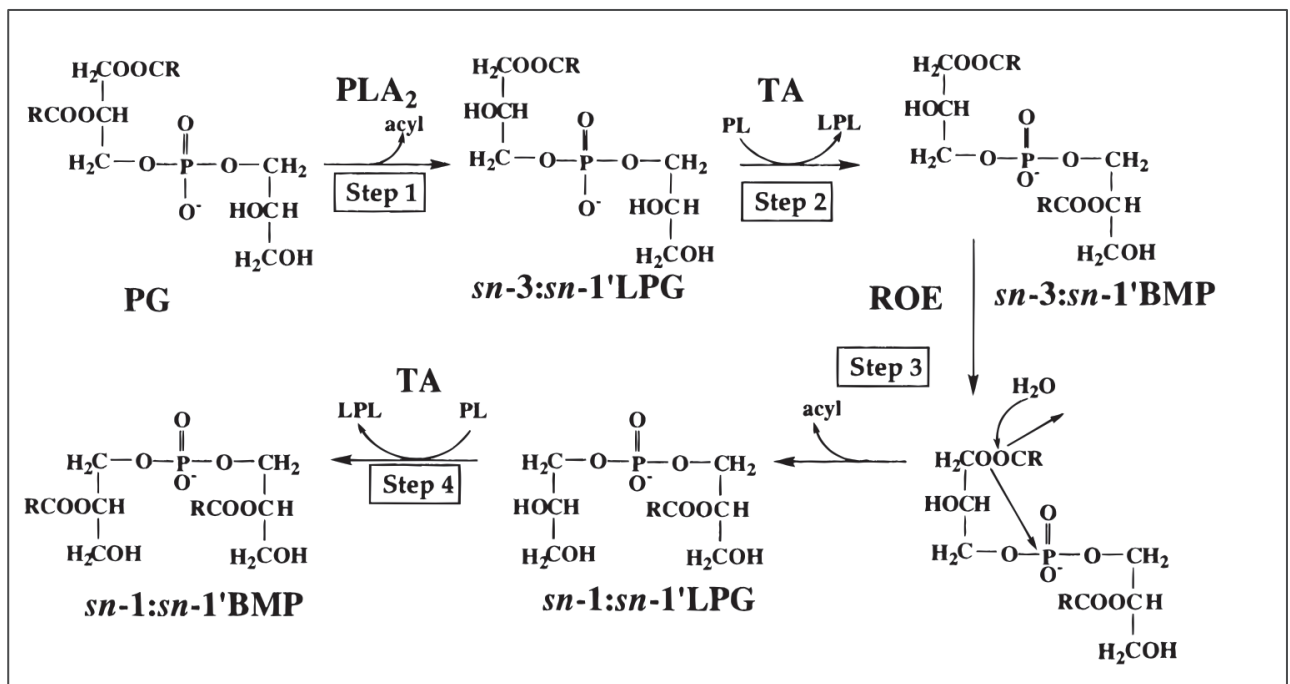


Figure 39. Voie de synthèse du BMP (Amidon et al., 1996).

Abréviations : PG : phosphatidylglycérol, LPG : lyso-phosphatidylglycérol, BMP : bismono(acylglycéro)phosphate

## b. Catabolisme

Le BMP est peu sensible à la dégradation enzymatique cependant plusieurs activités d'hydrolyses ont été rapportées. Le BMP extrait de cellules utérines de rat peut être hydrolysé in vitro par la lipase de *R. arrhizu* (Luquain et al., 2000). Le BMP peut aussi être hydrolysé par une phosphodiesterase acide présente dans les lysosomes (Matsuzawa and Hostetler, 1980) ainsi que par des phospholipase acide (PLA) telles que la PLA (Cochran et al., 1987), la PLA<sub>2</sub> (Ito et al., 2002), la PLRP2 (pancreatic lipase-related protein 2) (Record et al., 2011).

Ces PLA sont des hydrolases acides des phospholipides, elles sont localisées de façon ubiquitaire dans les cellules et hydrolysent un acide gras. L'ABHD6 ( $\alpha/\beta$  hydrolase domain containing 6) est une enzyme à activité monoacylglycérol hydrolase pouvant hydrolyser le BMP (Grabner et al., 2020). La sphingomyélinase acide (ASM), grâce à sa fonction phosphodiesterase, peut hydrolyser de nombreux lipides dont le BMP (Breiden and Sandhoff, 2021). Elle est active à pH acide au niveau des endolysosomes.

#### **4. Distribution, localisation**

Le BMP est retrouvé dans la majorité des cellules mammifères mais aussi dans les archées et certaines bactéries alcalinophiles (Nishihara et al., 1982; Rodriguez-Paris et al., 1993). Cependant il est absent chez les levures. Dans les cellules mammifères, les niveaux de BMP sont faibles : 1 à 2 % des phospholipides totaux. Le BMP est localisé au niveau du compartiment endolysosomal acide comprenant les endosomes tardifs et les lysosomes (Hullin-Matsuda et al., 2014; Kobayashi et al., 1998). Toutefois, sa concentration maximale est au niveau des endosomes tardifs. Le BMP y représente environ 30% des PL totaux et sa proportion peut atteindre 70% dans les membranes internes (Hullin-Matsuda et al., 2007; Kobayashi et al., 2002).

#### **5. Rôle cellulaire**

Le premier outil utilisé pour étudier les fonctions du BMP est l'anticorps anti-BMP. Cet anticorps anti-BMP a été développé par l'équipe de Kobayashi et al., (Kobayashi et al., 1999, 1998). L'anticorps anti-BMP ajouté dans le milieu de culture avec des cellules BHK est internalisé dans les cellules par endocytose et s'accumule au niveau des endosomes tardifs où il se fixe à son antigène (Hurley, 2008).

##### **a. Biogenèse et dynamique des vésicules endocytiques**

De nombreuses études réalisées sur cellules en culture ont démontré le rôle majeur du BMP dans la formation et la dynamique de la membrane des endosomes tardifs. Ainsi, le BMP possède la capacité intrinsèque de fusionner les membranes des liposomes à des valeurs de pH similaires à celles retrouvées dans les endosomes tardifs/lysosomes (Kobayashi et al., 2002).

Des études *in vitro* ont démontré la capacité du BMP à provoquer spontanément la formation de liposomes multivésiculaires ressemblant aux endosomes tardifs, eux même multivésiculaires (Matsuo et al., 2004). De la même façon, le bourgeonnement de vésicules à l'intérieur des endosomes tardifs serait dépendant du gradient de pH présent dans les membranes endosomes *in vivo* et serait contrôlé par la protéine Alix. Alix est associé à certaines protéines du complexe ESCRT (« Endosomal Sorting Complex Required for Transport ») impliqué dans l'invagination des membranes endosomales et la formation des corps multivésiculaires (Hurley, 2008). Il a été suggéré que le BMP, sous le contrôle de la protéine Alix, régule la formation des membranes intraluminales à l'intérieur des endosomes tardifs (Falguières et al., 2008).

Une diminution du taux de BMP ainsi qu'une réduction associée des quantités de cholestérol et de vésicules intraluminales est observée lors de l'extinction de la protéine Alix. Ces diminutions sont réversibles par supplémentation des cellules en DHA exogène (Chevallier et al., 2008). Les fonctions de cette protéine Alix dans ce processus ne sont pas connues mais le fait que cette protéine lie les membranes contenant du BMP, pourrait suggérer un rôle de régulateur/modulateur de signal (Matsuo et al., 2004). Il a également été suggéré que les membranes externes des endosomes tardifs interagissent dynamiquement avec la membrane limitante grâce à des mécanismes de fusion/fission contrôlés par le BMP et Alix, probablement via une interaction directe avec des complexes protéiques présents dans le cytosol (Falguières et al., 2009; Matsuo et al., 2004).

La charge négative du BMP et son enrichissement en acides gras insaturés entraînent la formation de vésicules intraluminales dans les endosomes (Gruenberg, 2020; Matsuo et al., 2004). Ces vésicules sont importantes pour le devenir des protéines et des lipides endocytés non seulement en médiant leur transport vers le lysosome pour la dégradation mais aussi en étant libéré sous forme de vésicules extracellulaires après la fusion des endosomes multivésiculaires avec la membrane plasmique. Les vésicules extracellulaires sont des vésicules membranaires provenant du compartiment endosomal ou du bourgeonnement de la membrane plasmique. Ces vésicules sont autrement appelées exosomes. Le rôle du BMP dans la biogenèse et la sécrétion des vésicules extracellulaires a été suggéré en raison notamment de localisation spécifique dans les vésicules intraluminales. Récemment une étude a démontré la présence de BMP dans les exosomes de différents modèles notamment dans des exosomes isolées d'urine humaine, des exosomes sécrétés par les cellules rénales HEK 293 (Rabia et al., 2020)

#### **b. Trafic du cholestérol**

Le BMP joue plusieurs rôles dans le transport et le métabolisme du cholestérol. Le cholestérol issu des lipoprotéines de basses densités (LDL) est distribué dans la cellule à partir de l'endosome tardif. Le cholestérol libre va sortir des endosomes tardifs par le biais des protéines NPC1 et NPC2, protéines mutées dans la maladie de Niemann Pick Type C (NPC). Dans le cas de cette maladie, une accumulation pathologique de cholestérol dans le compartiment endolysosomal est observée. Des mutations de gènes NPC1 et NPC2 sont la cause de cette maladie. Ces deux protéines sont impliquées dans la sortie du cholestérol libre des endosomes/lysosomes tardifs.

Un rôle spécifique du BMP dans le phénotype NPC a été mis en évidence par Kobayashi et al (Kobayashi et al., 1999). Récemment, des études ont démontré qu'une interaction physique entre le BMP et NPC 2 est nécessaire au transport du cholestérol par NPC 2 (McCauliff et al., 2019).

Une étude a démontré que le BMP et la protéine Alix jouaient un rôle dans le trafic du cholestérol. En effet, la diminution de l'expression d'Alix dans des cellules Hela par siARN entraîne une diminution du BMP, suggérant un lien fonctionnel. Le contenu en cholestérol était aussi diminué ainsi que le nombre de vésicules intravésiculaires dans les endolysosomes. Les auteurs concluent que la diminution du cholestérol intracellulaire est due à la diminution des vésicules intravésiculaires. Par ailleurs, en incubant des cellules NPC avec des liposomes de BMP, ils ont montré une diminution de l'accumulation du cholestérol cellulaire, concluant que le BMP pourrait renverser le phénotype NPC et serait donc limitant dans cette pathologie (Chevallier et al., 2008).

Des travaux antérieurs de l'équipe ont montré que lors de l'incubation de l'anticorps anti-BMP avec des macrophages RAW et THP-1, l'homéostasie du cholestérol intracellulaire est modifiée : une augmentation du cholestérol libre est observée, sans modification de la capacité d'estérification du cholestérol des cellules. Dans le cas d'une surcharge en cholestérol médiée par des LDL acétylées, une augmentation du cholestérol présent dans la membrane plasmique est observée alors que l'efflux cholestérol vers les HDL est diminué (Delton-Vandenbroucke et al., 2007).

Grâce à un modèle de supplémentation par le précurseur PG qui entraîne une synthèse de BMP, l'équipe a montré qu'un taux augmenté de BMP intracellulaire perturbe le trafic du cholestérol issu des LDL, entraînant une diminution de l'expression des transporteurs ABC G1 et A1 et de l'efflux du cholestérol par les HDL (Luquain-Costaz et al., 2013).

Un rôle protecteur du BMP contre l'oxydation du cholestérol a par ailleurs été mis en évidence. Les produits obtenus après l'oxydation du cholestérol sont appelés les oxystérols. Les oxystérols s'accumulent dans les macrophages soit issus des LDL oxydées soit produits après oxydation intracellulaire du cholestérol dans les endosomes tardifs (Chen et al., 2015). Le rôle protecteur du BMP sur la production des oxystérols et leurs effets pro-apoptotiques est dépendant de la protéine ORP 11 (oxysterol-binding protein-related protein 11) (Arnal-Levron et al., 2019).

L'ensemble de ces travaux suggère donc que le BMP régule le transport du cholestérol depuis les endosomes tardifs vers des compartiments qui régulent sa synthèse, son métabolisme oxydatif et son efflux (Arnal-Levron et al., 2019; Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Luquain-Costaz et al., 2013).

D'autres études ont démontré que le D-PDMP (D-thréo-1-phényl-2-décanoylamino-3-morpholino-1-propanol) s'accumule dans les endosomes tardifs des cellules BHK en culture et altère la structure et l'organisation des membranes indépendamment de son effet inhibiteur sur la synthèse des glycosphingolipides. Le D-PDMP altère le fonctionnement des membranes et l'homéostasie du cholestérol cellulaire en modulant les domaines BMP (Makino et al., 2006).

Enfin, un lien entre BMP et autophagie a été démontré dans des modèles NPC1. L'incubation de PG avec des fibroblastes déficients en NPC1 entraîne une augmentation du BMP intracellulaire qui stimule l'autophagie et réduit le stockage du cholestérol (Ilnytska et al., 2021).

### **c. Infection virale**

Le BMP a récemment été impliqué dans les infections virales. En effet, les virus à ARN tel que la Dengue ou le SARS CoV-2 ont besoin de phospholipides anioniques comme le BMP pour infecter les cellules de l'hôte (Luquain-Costaz et al., 2020). Les virus sont d'abord internalisés puis rejoignent la voie endosomale pour être libérés dans le cytosol afin de propager l'infection. Ce détournement nécessite une composition lipidique spécifique de la membrane des endosomes (Carpio and Villalain, 2020; Luquain-Costaz et al., 2020).

Une corrélation entre le BMP et l'infection virale a notamment été montrée dans les cellules HeLa infectées par le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV). Le VSV infecte les cellules par la voie endocytaire et le pH acide de l'endosome tardif déclenche la fusion de l'enveloppe du VSV avec les membranes endosomales permettant la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme et la réplication virale qui s'ensuit (Matsuo et al., 2004). Des études ont suggéré que le BMP en coopération avec la protéine Alix contribueraient à ces mécanismes de fusion membranaire essentiels à la libération de la nucléocapside du VSV dans le cytoplasme. En effet le BMP localisé sur le feuillet cytosolique des endosomes tardifs recrute Alix et ses protéines associées.

Une fois lié au BMP, Alix change de conformation perturbant la fusion des vésicules intraluminales. La répression d'ALIX médiée par des siARN réduit l'infection virale dans les cellules HeLa ainsi que le niveau de BMP d'environ 50% (Daro et al., 1997).

De plus, il a été démontré qu'après l'utilisation de l'anticorps anti-BMP, une immobilisation du BMP dans les endosomes entraînerait une diminution de l'infection par le virus de la Dengue (Carrière et al., 2020).

Récemment des revues ont mis en évidence le double rôle du BMP dans les infections virales. Le rôle du BMP serait pro-viral ou anti-viral selon que l'infection a lieu respectivement sans ou lors de perturbations endosomales. Ces perturbations entraînent une augmentation ou une diminution du BMP et/ou une augmentation du pH des endosomes (Carrière et al., 2020; Luquain-Costaz et al., 2020).

#### **d. Autres fonctions cellulaires du BMP**

Le BMP stimule également la dégradation enzymatique des sphingolipides et glycosphingolipides dans les endosomes tardifs (Kolter and Sandhoff, 2005)(Kolter and Sandhoff, 2005). Les enzymes impliquées dans cette dégradation sont des exohydrolases solubles. Elles nécessitent la présence de cofacteurs appelés SAPs (sphingolipid activator proteins) ou saposines. Il a été montré que le BMP interagit directement avec la saposine C et que cette interaction est impliquée dans le processus de dégradation des sphingolipides (Chu et al., 2005).



#### **IV. Les acides gras chez les trypanosomatidés**

##### **1. Composition en acides gras des parasites *Leishmania***

La composition en acides gras des lipides totaux, les principales classes de ou les principales classes de PL ont été étudiées chez plusieurs espèces de *Leishmania*, en particulier *L. infantum*, *L. donovani* et *L. major*. Des différences de composition en acides gras ont été rapportées entre le plasma de l'hôte mammifère et les parasites, suggérant que les parasites régulent étroitement leur composition en acides gras. Chez les parasites *Leishmania*, la composition en AG a été conservée, avec une prédominance des acides gras C16 et C18 (Beach 1979 ; Wassef 1985 ; Adosraku 1993 ; Zheng 2010 ; de Azevedo 2014 ; Mathur, 2015 ; Bouazizi 2017 ; Bouabid, 2022). Ceux-ci incluent les acides gras saturés acide palmitique (16:0) et acide stéarique (18:0), l'acide oléique monoinsaturé (18:1n-9) et les acides gras polyinsaturés essentiellement linoléique (18:2n-6) et pour abaisser degré alpha linoléique (18:3n-6) et acide linoléique (18:3n-3). Chez plusieurs *Leishmania spp* (par exemple chez *L.infantum*, *L.donovani* et *L.major*), les lipides des promastigotes contiennent également des acides gras polyinsaturés à longue chaîne, en particulier des niveaux élevés d'acides gras C22n-3 tels que 22:6n-3 et 22:5n-3 contrairement à n-6 acides gras tels que 20:4n-6 et 22:5n-6 qui ne sont présents qu'à l'état de traces (Beach 1979 ; Zheng 2010 ; Mathur, 2015 ; Bouazizi 2017 ; Bouabid, 2022).

##### **2. Voie de synthèse des acides gras chez *Leishmania***

Il a été longtemps considéré que les trypanosomatidés avaient une capacité faible voire nulle de biosynthèse des acides gras (Dixon et al., 1971). Dans les années 1970, des études ont mis en évidence des gènes impliqués dans la synthèse d'acides gras saturés et insaturés chez ces parasites. Ainsi, les parasites acquièrent les acides gras par synthèse *de novo* et via leur environnement hôte.

###### **a. Les AG saturés**

Les trypanosomes disposent d'un équipement enzymatique permettant la synthèse des AG saturés : le système d'élongase (ELO). Les enzymes ELO sont des protéines membranaires intégrales du réticulum endoplasmique qui catalysent l'extension des chaînes acyles. L'élongase 1 ou ELO1 étend principalement C4 à C10 c'est-à-dire de l'acide butyrique à l'acide caprique. ELO2 étend de C10 à C14 (acide caprique à l'acide myristique) et ELO3 de C14 à C18 (acide myristique à l'acide stéarique) (Lee et al., 2006).

La polyvalence de la voie ELO est renforcée du fait qu'elle peut être régulée selon les besoins du parasite. En effet, la voie est notamment régulée à la hausse lorsque les parasites sont cultivés dans un milieu à faible teneur en lipides (Lee et al., 2006).

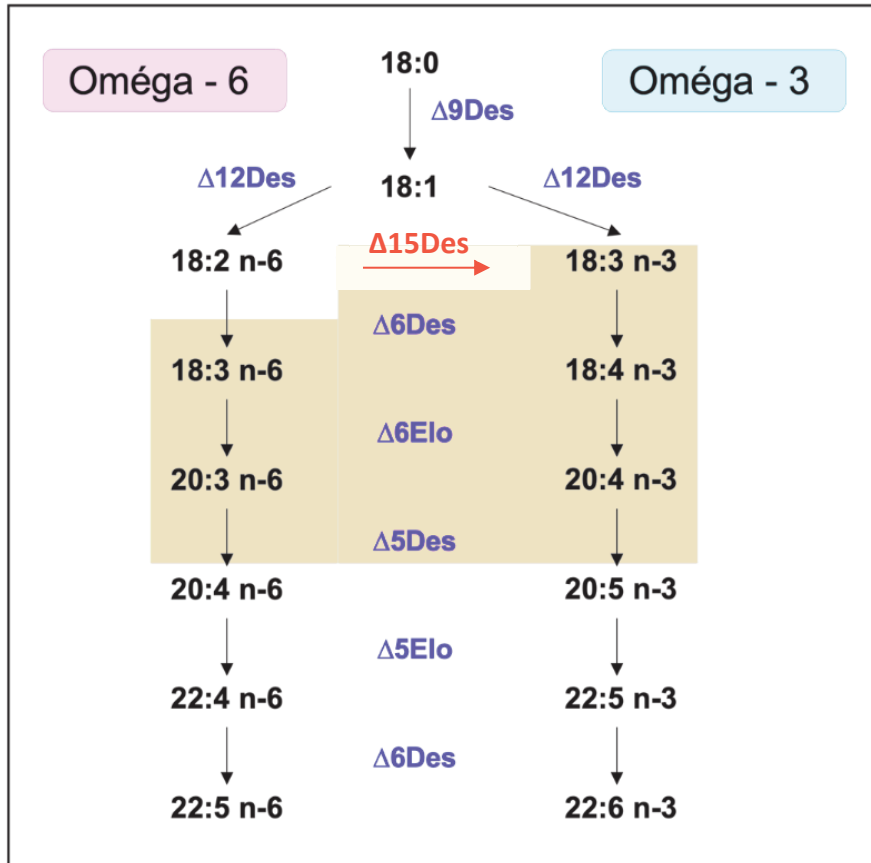
### **b. Les AG insaturés et polyinsaturés**

Chez trois espèces de parasites appartenant à la famille des trypanosomatidés (*T. cruzi* ; *T. brucei* et *L. major*) une voie de synthèse des AGI et AGPI a été décrite. La première étape commune aux 3 souches fait intervenir la désaturase  $\Delta 9$ Des (Figure 40). Elle convertit l'acide stéarique 18:0 (formé *de novo* ou capté chez l'hôte) en 18:1n-9 (acide oléique).

Contrairement aux mammifères, les parasites sont capables de synthétiser l'acide linoléique et l'acide  $\alpha$ -linoléique (Lee et al., 2007) à partir de l'acide oléique grâce à l'enzyme  $\Delta 12$ Des. Une particularité de *L. major* est d'exprimer l'enzyme  $\Delta 15$ Des qui permet la conversion du 18:2n-6 en 18:3n-3. Chez ce parasite, une série de réactions permet de convertir le 18:2n-6 en 20:4n-6 et le 18:3n-3 en 20:5n-3 selon des étapes successives d'élongation et de désaturation qui utilisent les désaturases ( $\Delta 6$  et  $\Delta 5$ Des) ainsi qu'une élongase  $\Delta 6$ ELO pour la synthèse de l'AA (20:4n-6) et de l'EPA (20:5n-3).

Les enzymes  $\Delta 5$ ELO et  $\Delta 4$ FAD sont en revanche présentes chez les trois espèces :  $\Delta 5$ ELO convertit le 20:4n-6 (AA) en 22:4n-6 ainsi que le 20:5n-3 en 22:5n-3 ;  $\Delta 4$ FAD permet la synthèse de 22:5n-6 et 22:6n-3 (Uttaro, 2014). La présence de la  $\Delta 5$ ELO chez *T. cruzi* et *T. brucei* permet la synthèse des AGPI à 22 carbones en utilisant les AG précurseurs AA et EPA qui sont relativement abondants chez l'hôte mammifère (Veronica et al., 2007).

Les désaturases catalysent l'introduction de doubles liaisons entre l'extrémité carboxylique d'une molécule et une double liaison préexistante pour introduire une insaturation supplémentaire dans les AGPI existants ou fabriquer des AGPI *de novo*. Contrairement aux désaturases frontales, les désaturases à extrémité méthyle telles que les désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  aident à ajouter une double liaison entre les doubles liaisons préexistantes et l'extrémité méthyle dans les acides gras. Contrairement à *Leishmania*, les mammifères, ne peuvent pas produire d'acides gras oméga-3 et oméga-6 car ils manquent de désaturases  $\Delta 12$  et  $\Delta 15$  ( $\omega 3$ ). Ces deux désaturases sont des enzymes importantes dans la synthèse des acides gras oméga-6 et oméga-3 chez *L. major* car elles ajoutent respectivement une double liaison en 12<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> positions carbone-carbone des AG, ce qui indique que les doubles liaisons sont placées aux 3<sup>e</sup> et 6<sup>e</sup> liaisons carbone-carbone des extrémités méthyle des acides gras (Lee et al., 2016).



**Figure 40.** Biosynthèse des acides gras insaturés chez *Leishmania* spp.

(Jaune : présent chez *L. major*, absent chez *T. brucei* et *T. cruzi*)

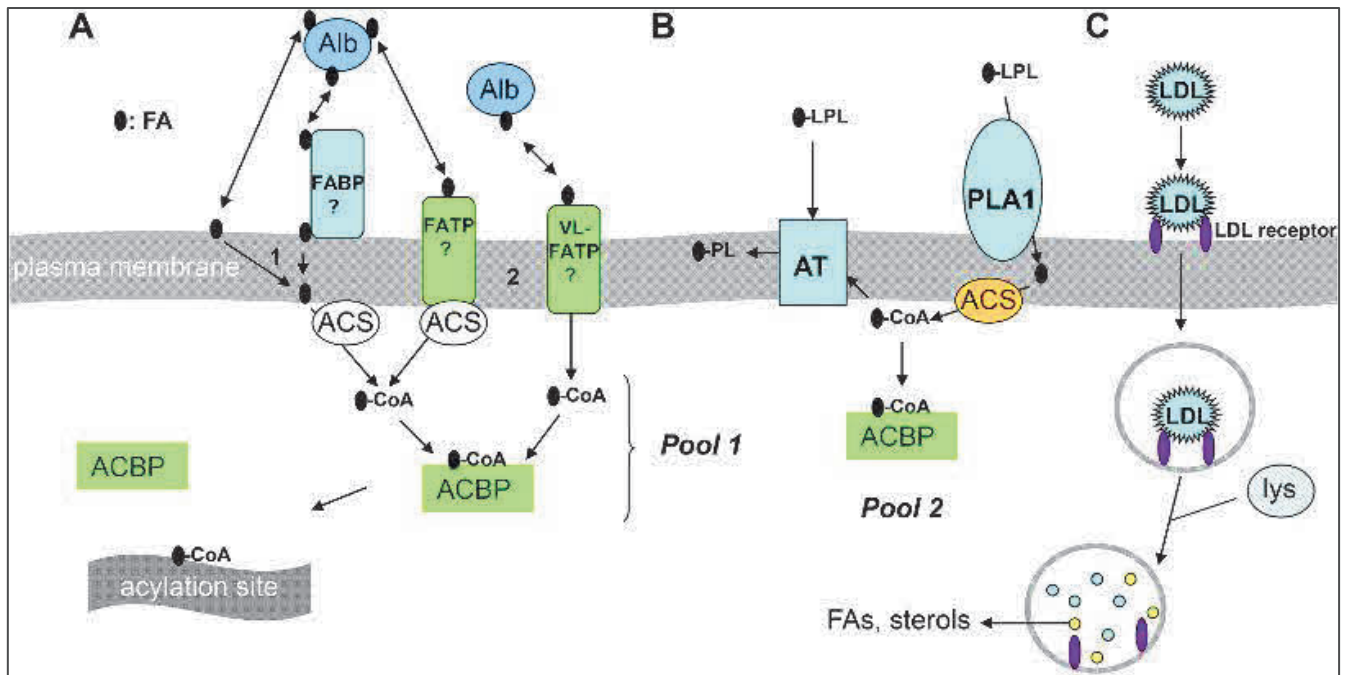
Abréviations : Des : désaturase, Elo : élongase

### 3. Mécanisme de captation des acides gras

La récupération des lipides de leurs hôtes, en tant que source d'acide gras, par le parasite, se fait de différentes façons (Figure 41) :

- (A) Les acides gras libres liés à l'albumine sérique se lient à la surface du parasite. Cette liaison peut être assistée par des protéines de liaisons d'acide gras (fatty acid binding protein, FABP)
- (B) Une fois à la surface cellulaire, les AG peuvent traverser la membrane plasmique par diffusion passive ou par translocation via une protéine de transport d'acide gras comme la FATP (Fatty Acid Transport Protein).

- (C) L'endocytose est une voie bien établie dans l'acquisition des AG et elle se produit exclusivement dans la poche flagellaire des trypanosomatidés (Aquino et al., 2021). Les lipoprotéines plasmatiques de l'hôte telles que les LDL représentent une source principale de stérols et de phospholipides. Celles-ci sont internalisées par endocytose médiée par des récepteurs. Une fois internalisés, les récepteurs sont recyclés et la molécule de LDL est dégradée dans le lysosome libérant des esters de cholestérol, du cholestérol, des phospholipides et des acides gras.



**Figure 41.** Sources d'acides gras pour les trypanosomatidés (Uttaro, 2014). Abréviations : FA : acides gras, Alb : albumine, FABP : protéines de liaison des acides gras, FATP : protéine de transport des acides gras, ACS : acyl-CoAsynthétase, ACBP : protéines de liaison à l'acyl-CoA, VL-FATP : protéine de transport des acides gras à longues chaînes, LPL : lysophospholipides, PLA1 : phospholipase A1, AT: acyl CoA acyltransférase, PL : phospholipides, LDL : lipoprotéines.

#### **4. Le rôle des acides gras**

##### **a. Fournisseur d'énergie et matériel de stockage**

Dans le cytoplasme commence l'oxydation des AG. Ils sont convertis en acyl-CoA qui se combine avec la carnitine pour former une acyl-carnitine qui est alors transportée à travers la membrane de la mitochondrie. Une fois à l'intérieur, la molécule d'acyl-carnitine est reconvertie en acyl-CoA, qui est ensuite complètement décomposée par un cycle de réactions qui clive deux carbones à la fois de son extrémité carboxyle pour générer une molécule d'acétyl CoA pour chaque tour du cycle. Lors de ce processus, une molécule de NADH et une molécule de FADH<sub>2</sub> sont produites. L'acétyl-CoA nouvellement formée entre dans le cycle de l'acide citrique où le groupe acétyle est oxydé en CO<sub>2</sub> et plusieurs molécules du transporteur d'électrons NADH sont générées de la même manière que l'acétyl-CoA dérivée du pyruvate (de Carvalho and Caramujo, 2018).

##### **b. Rôle dans l'entrée et la survie des parasites dans les macrophages**

- **Modulation de la réponse inflammatoire de l'hôte**

Les dérivés oxygénés d'AGPI ont été impliqués dans la réponse de l'hôte à une infection par des parasites *Trypanosoma* ou *Leishmania*. Il a également été démontré que ces parasites étaient capables de produire à la fois des médiateurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, notamment les médiateurs spécialisés dans la résolution (specialized pro-resolving mediators, SPM), modulant ainsi les réponses des macrophages à l'infection parasitaire (Colas et al., 2018; López-Muñoz et al., 2018; Machado et al., 2011; Paloque et al., 2019).

Les eicosanoïdes jouent un rôle important au cours de l'infection à *Leishmania*. Des études ont révélé que *Leishmania* utilise des prostaglandines pour échapper aux barrières innées, permettant ainsi aux parasites de survivre à l'intérieur des cellules immunitaires. L'équilibre entre les médiateurs lipidiques, principalement les eicosanoïdes leucotriène B<sub>4</sub> et prostaglandine E<sub>2</sub> est une composante importante de la réponse inflammatoire et du résultat de l'infection par *Leishmania*. Des études ont démontré que la production des PGE<sub>2</sub> profite à la survie du parasite tandis que la production de leucotriènes LTB<sub>4</sub> est lié à la destruction du parasite par les cellules hôtes (Afonso et al., 2008; Bhattacharjee et al., 2016; Tavares et al., 2016, 2014).

La LTB4 est impliquée dans la production de NO et réduit la charge parasitaire dans différents modèles cellulaires d'infection par *L. amazonensis* (Lefèvre et al., 2013; Serezani et al., 2006; Tavares et al., 2014). Par ailleurs, une étude a démontré que les promastigotes de *Leishmania* sont capables d'inhiber les réactions inflammatoires en activant le récepteur de la lipoxine A4 leur permettant une meilleure survie intracellulaire (Wei et al., 2019).

Afin d'évaluer l'importance de la PGE2 au cours de la leishmaniose, des souris BALB/c infectées par *L. mexicana* ont été traitées avec de l'indométacine (inhibiteur des COX). Les animaux traités présentaient une réduction de la taille des lésions associée à des niveaux réduits d'IL-4, d'IL-10 et de PGE2 dans les surnageants des splénocytes (Guimarães et al., 2006).

Une étude a démontré que des macrophages traités avec un inhibiteur réversible de l'enzyme COX suivi d'une infection par *L. infantum* n'a pas inversé la charge parasitaire, sous-entendant que les prostaglandines provenant du parasite sont liées à sa persistance (Araújo-Santos et al., 2014).

Une étude récente a comparé les profils des médiateurs pro-inflammatoires et des SPM chez les promastigotes de *Leishmania* non infectieux (procycliques) et infectieux (métacycliques), révélant que des métabolites oxygénés de l'AA et du DHA étaient augmentés sous la forme métacyclique. Les auteurs ont en outre montré que l'exposition des macrophages aux extraits lipidiques de promastigotes infectieux contenant à la fois des dérivés AA et DHA induisait la production de SPM dans les macrophages, et leur polarisation en phénotype M2 (Paloque et al., 2019).

- **La myristoylation**

Deux principaux types d'acides gras sont liés aux protéines acylées grasses : le myristate et le palmitate. L'enzyme myristoyl-CoA : protéine N-myristoyltransférase (NMT) catalyse une modification protéique, la fixation du myristate lipidique C14:0 (Myr, acide tétradécanoïque) au résidu glycine N-terminal de protéines cibles spécifiques dans la cellule. Cette réaction se produit au cours de la synthèse ribosomique de la protéine favorisant la localisation de la protéine dans les membranes cellulaires (Wright et al., 2010). Le myristate est un AGS à 14 carbones directement lié à l'extrémité N-terminale de certaines protéines dans un processus de N-myristoylation. La N-myristoylation est essentielle pour le bon fonctionnement et la localisation de plusieurs protéines de signalisation.

Il est une cible potentielle de médicaments pour les infections causées par les leishmanioses (Price et al., 2003). La NMT a été caractérisé chez *L. donovani* ainsi que chez *L. major* et contribue à la survie des promastigotes chez le vecteur (Brannigan et al., 2010).

Par bio-informatique, l'équipe de Mills et al., a identifié environ 60 protéines de *Leishmania* qui sont N-myristoylées ; cependant six seulement ont été rapportées expérimentalement. Parmi ces 6 protéines, celles-ci incluent un double motif d'acylation N-myristoylation et S-palmitoylation ainsi que des facteurs d'EDP-ribosylation (Wright et al., 2015).

Le myristate est également un composant des ancras lipidiques glycosphosphatidylinositol (GPI) qui attachent les principales classes de molécules de surface chez les trypanosomatidés. Chez *Leishmania*, les ancras GPI contenant du myristate des glycoinositolphospholipides de surface sont remodelées pendant la synthèse par une réaction impliquant l'échange de myristate à partir d'un donneur de myristoyl-CoA (Price et al., 2003).

### **c. Dans la différenciation promastigote/amastigote**

Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence des modifications de la composition en acides gras des lipides du parasite *Leishmania* au cours de la différenciation de la forme promastigote en forme amastigote (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017). Ces modifications ont été décrites au sein des PL totaux, des TAG et de la fraction des AG libres. Chez les amastigotes, une augmentation des AGS et AGMI est observée (majoritairement 16:0 et 18:1 n-7) ainsi qu'une diminution des AG n-6 totaux quelle que soit la classe de lipide étudiée (PL, TG et AG libres). A l'inverse, les précurseurs n-6 18:2 et 18:3 ont été spécifiquement diminués. La composition lipidique des AG est proche de celles des cellules hôtes suggérant que le remodelage des lipides chez les amastigotes pourrait dépendre des AG et/ou des activités désaturase/élongase disponibles dans les macrophages. De plus, une augmentation significative de la proportion de 20:4 n-6 (AA) et 22:6 n-3 (DHA) chez les amastigotes a été observée, en particulier dans les phospholipides. La composition lipidique des AG est proche de celles des cellules hôtes suggérant que le remodelage des acides gras dans les lipides des amastigotes pourrait dépendre des AG et/ou des activités désaturase/élongase disponibles dans les macrophages. Ces modifications peuvent également suggérer une régulation des enzymes chez les amastigotes (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017).

#### **d. La résistance aux médicaments**

Une équipe a étudié les modifications biochimiques se produisant chez *L. donovani* résistant à la miltéfosine (HePC : hexadécylphosphocholine). La composition lipidique étant directement liée à la fluidité membranaire cela peut influencer les interactions médicament-membrane. Dans cette étude, ils se sont concentrés sur les principaux paramètres déterminant la fluidité, c'est-à-dire l'insaturation des chaînes alkyles d'acides gras dans les composants membranaires. Ils ont observé une inactivation partielle de l'allongement des chaînes alkyles chez les parasites résistants au HePC (HePC-R) suggérant une fluidité plus faible des membranes de ces parasites. Ils ont aussi observé une teneur en C16 deux fois plus élevée dans les parasites HePC-R que dans les parasites WT et la teneur en C18 était de moitié comparé aux parasites WT (Rakotomanga et al., 2005).

L'équipe de Azevedo et al., a comparé les profils d'acides gras de *L. infantum* et *L. amazonensis* résistants et sensibles à l'antimoine trivalent. Les niveaux d'acides gras 18 :1 étaient augmentés dans les isolats sensibles tandis que l'acide gras 20:4n-6 était diminué. L'insaturation des acyles gras diminue les états ordonnés des membranes et augmente la fluidité membranaire. Une insaturation accrue en acides gras a été aussi rapportée chez des parasites *Leishmania* résistants à plusieurs médicaments dont la miltéfosine (Rakotomanga et al., 2005) et l'amphotéricine B (Mbongo et al., 1998). Ces changements dans les compositions en acides gras des lipides de la membrane plasmique peuvent moduler les interactions médicamenteuses et être impliqués dans la résistance aux médicaments. Une proportion plus élevée d'acides gras 20:4 n-6 dans les principaux PL des isolats de *L. infantum* résistants à l'antimoine pourrait avoir un effet sur le transport de l'antimoine et entraînerait une modification de la sensibilité aux antimoniés chez ces parasites (t'Kindt et al., 2010).

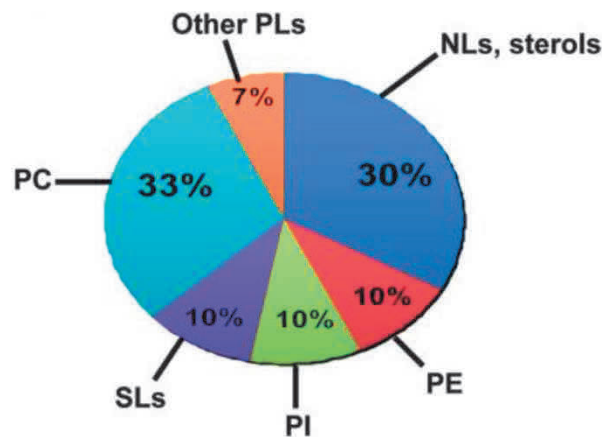
### **V. Autres lipides importants chez *Leishmania***

#### **1. Les phospholipides et les sphingolipides.**

Les phospholipides représentent 70% des lipides cellulaires totaux de *Leishmania*. Les principales espèces de PL sont les phosphatidylcholines (PC) (30 à 40%), les phosphatidyléthanolamines (PE) (10%) et les phosphatidylinositols (PI) (10%) (Zhang and Beverley, 2010). Les phosphatidylglycérols (PG), cardiolipines (CL) et acide phosphatidique ne sont présents que sous forme de traces.



Les lipides neutres ainsi que les stérols représentent, quant à eux, 30% des lipides totaux. Les sphingolipides représentent les 10% restants (Figure 42).



**Figure 42.** Représentation des différentes classes de lipides chez *Leishmania* (Zhang and Beverley, 2010).

*Leishmania*, contrairement aux mammifères, ne synthétise pas de sphingomyéline ou de glycosphingolipides. Les principaux sphingolipides de *L. major* sont l'inositol phosphorylcéramide non glycosylé (IPC) et la céramide. Les IPC comprennent le phosphoryl inositol N-stéaroylhexadécésphing-4-énine (d16:1/18:0-IPC), espèce dominante, et le phosphoryl inositol N-stéaroylsphingosine (d18:1/18:0-IPC).

#### a. Le rôle des phospholipides

Les SL sont essentiels à la survie et la différenciation des promastigotes en phase stationnaire tandis que les PL servent pour des facteurs de surface importants. Chez *Leishmania*, les LPG et GPI sont importants dans la virulence et le développement du parasite (Traité dans le Chapitre I) (Zhang and Beverley, 2010).

La composition des PL et des SL entre l'hôte et le parasite sont assez différents et reflètent la différence de physiologie membranaire entre les parasites et les hôtes. Ces lipides peuvent déterminer la perméabilité et la fluidité de la membrane et avoir un impact sur le trafic vésiculaire ainsi que sur l'acquisition de nutriments par endocytose ou la différenciation cellulaire impliquant le remodelage de la membrane.

La différence de composition entre l'hôte et *Leishmania* dans la composition lipidique pourrait être exploitée. En effet, des analogues de lysophospholipides tels que la miltéfosine, l'edelfosine et l'ilmofofosine ont montré un effet anti-prolifératif *in vitro* très élevé sur *L. donovani* (Azzouz et al., 2006). La miltefosine a été utilisée comme médicament oral contre *L. mexicana* et *L. braziliensis* (Soto and Berman, 2006). Actuellement la miltéfosine est le seul médicament oral utilisé contre la leishmaniose. Cette molécule affecte la voie de biosynthèse des phosphatidylcholines. L'edelfosine ainsi que l'ilmofofosine ont des effets inhibiteurs de la synthèse des lipides membranaires et des effets inducteurs de l'apoptose ou la nécrose (Azzouz et al., 2007; Rakotomanga et al., 2005).

## 2. Les stérols

Les stérols sont des constituants majeurs des membranes cellulaires essentiels pour leur structure et leurs fonctions. Chez les mammifères, le cholestérol est le principal stérol des membranes tandis que chez les trypanosomatidés, c'est l'ergostérol. En effet, les parasites ne sont pas capables de synthétiser le cholestérol, bien qu'ils puissent en contenir des traces (Yao and Wilson, 2016). Chez les promastigotes de *Leishmania*, l'ergostérol et d'autres précurseurs ont été identifiés tels que l'ergosta-5,7,24 (241) -trien-3 $\beta$ -ol (5-déhydroépistérol), l'ergosta-118 7,24 (241) dien-3 $\beta$ -ol (épistérol) et l'ergosta -5,7,22-triène- 3 $\beta$ -ol. Le premier étant plus abondant que les 2 autres (de Souza and Rodrigues, 2009).

### a. Le cholestérol

- Structure

Le cholestérol, lipide de la famille des stéroïdes, a une structure caractérisée par quatre cycles et une chaîne hydrocarbonée branchée. Il possède également une double liaison entre le carbone 5 et 6 et un groupement hydroxyle sur le carbone 3 en position  $\beta$ . Le cholestérol, au niveau cellulaire, existe de manière stable sous deux formes : une forme libre et une forme estérifiée.

Le cholestérol libre est un constituant majeur des membranes cellulaires et intervient dans différentes voies de signalisation tandis que le cholestérol estérifié est davantage une forme de stockage pour la cellule.

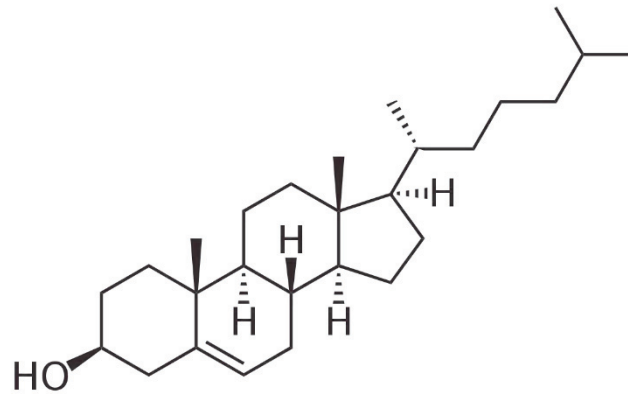


Figure 43. Structure du cholestérol.

- **Cholestérol et *Leishmania***

Les trypanosomatidés ont des gènes codant pour des enzymes catalysant la biosynthèse d'ergostérol mais pas celle du cholestérol. Le cholestérol est impliqué dans divers processus cellulaires tels que l'organisation et la dynamique des membranes, la transduction du signal et le tri moléculaire. Les taux sériques de cholestérol chez les patients sont en étroites corrélations avec la maladie. Dans le cas de *L. donovani*, l'hypercholestérolémie a une tendance à protéger tandis que l'hypocholestérolémie favorise l'infection des macrophages (Ghosh et al., 2012). De plus, la leishmaniose viscérale peut être favorisée par des taux élevés de triglycérides et de lipoprotéines de très basses densités et à de faibles taux de lipoprotéines de hautes densités (Carvalho et al., 2014).

Plusieurs études ont démontré le rôle crucial du cholestérol dans l'infection à *Leishmania*. Le cholestérol membranaire des cellules hôtes, notamment au niveau des radeaux lipidiques, est nécessaire à l'entrée du parasite dans les macrophages. L'inhibition de la phagocytose des promastigotes de *L. chagasi* ainsi qu'une diminution de leur capacité de réplification a été observée après traitement des macrophages par la méthylbetacyclodextrine (M $\beta$ CD). En effet, la M $\beta$ CD déplete le cholestérol membranaire et perturbe les radeaux lipidiques (Rodríguez et al., 2006).

La déplétion du cholestérol dans la lignée des macrophages J774 par la cyclodextrine a engendré une diminution de la liaison des promastigotes de *L. donovani*, une diminution de la phagocytose et du nombre de parasites sous forme amastigote, l'effet étant réversible avec l'apport de cholestérol exogène (Pucadyil et al., 2004).

L'appauvrissement des macrophages en cholestérol via l'utilisation de lovastatine, un inhibiteur de la HMGCoA reductase enzyme clé de la synthèse de novo de cholestérol, entraîne une réduction de l'entrée des parasites de *L. donovani* ainsi qu'une diminution de la charge d'amastigotes intracellulaires. La réduction de la capacité du parasite à pénétrer dans les macrophages est réversible après reconstitution métabolique du cholestérol de la membrane des cellules hôtes. Cependant, l'enrichissement des macrophages avec un excès de cholestérol induit une pénétration réduite par le parasite. En effet, un taux de cholestérol optimal de la membrane plasmique est nécessaire à l'entrée du parasite dans les cellules hôtes (Kumar et al., 2016).

Lors du traitement de macrophage de l'hôte avec des agents complexant du cholestérol tels que l'amphotéricine B, la séquestration du cholestérol dans la membrane des macrophages inhibe l'infection de *Leishmania*. La séquestration du cholestérol dans la membrane par l'amphotéricine B réduit efficacement sa capacité à interagir avec d'autres constituants membranaires tels que les récepteurs et conduit à une réduction de la liaison des parasites avec les macrophages (Paila et al., 2010).

## **b. L'ergostérol**

- **Structure**

Architecturalement le cholestérol et l'ergostérol diffèrent de peu : le cholestérol n'a qu'une double liaison dans le noyau en 7-8 et une chaîne latérale entièrement saturée sans groupe méthyle en C24. La formule brute de l'ergostérol est  $C_{28}H_{44}O$ .

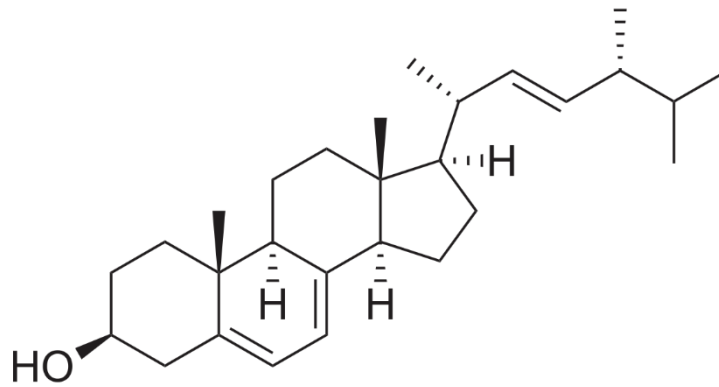
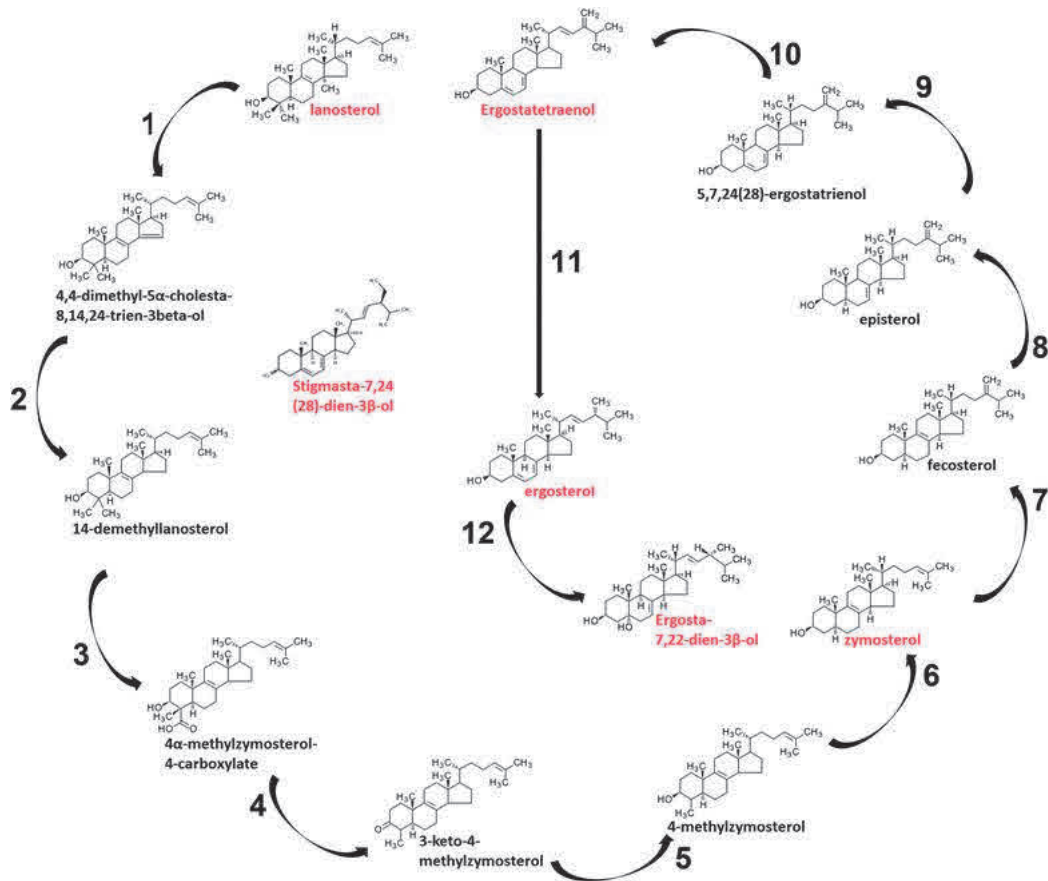


Figure 44. Structure de l'ergostérol.

- **Biosynthèse**

Le précurseur de l'ergostérol est le lanostérol. Celui-ci est obtenue à partir de l'acétate selon diverses réactions qui font intervenir l'enzyme limitante : l'HMGcoA reductase.

Une étape clé de la biosynthèse de l'ergostérol est l'ajout d'un groupe méthyle en position C24 dans la chaîne latérale des stérols. Selon le micro-organisme, cela se produit tôt après la production du lanostérol, comme observé chez *L. amazonensis*, ou au niveau du zymostérol (qui n'a pas les groupes méthyle C4 et C14 dans la structure) comme on le trouve chez *Leishmania spp* (de Souza and Rodrigues, 2009).



**Figure 45.** Voie de biosynthèse des stérols de *Leishmania* (Yao et al., 2016).

Les enzymes impliqués sont : 1 : lanostérol 14- $\alpha$ -déméthylase / 2 : stérol réductase C-14 / 3 : C-5 stérol désaturase / 4 : protéine analogue à la stéroïde déshydrogénase de type NAD (p) / 5 et 6 inconnus / 7 : 24-c-méthyltransférase de stérol / 8 : protéine de type stérol isomérase C-8 / 9 : protéine semblable à la Lathostérol oxydase / 10 : protéine semblable au cytochrome p450 / 11 : Sterol C-24 réductase / 12 : hydroxydéride déshydrogénase-isomérase

- **Rôle dans la virulence du parasite**

L'ergostérol est essentiel pour la croissance et la survie du parasite. De nombreuses études ont démontré son importance en se basant sur l'inhibition spécifique de sa biosynthèse, notamment avec des statines, des azolés ciblant la stérol 14- $\alpha$ -déméthylase (CD14M) (Xu et al., 2014), les quinuclidines et les alkylamines. Ces molécules induisent des altérations de l'ultrastructure de plusieurs organites tel que le complexe mitochondrie-kinétoplaste, le réticulum endoplasmique, les structures multivésiculaires, les inclusions lipidiques, la vacuole contractile ainsi que dans la membrane plasmique recouvrant le corps cellulaire et le flagelle.

Ainsi, le traitement de *L. amazonensis* avec différents composés azolés induit des altérations de la mitochondrie notamment la désorganisation des membranes mitochondriales interne ainsi qu'un gonflement intense et une perte de contenu de la matrice (Rodrigues et al., 2007). Cette altération a aussi été observée après un traitement avec la terbinafine et le kétoconazole (Lazardi et al., 1990).

L'ergostérol est un des composants majeurs de la membrane plasmique régulant sa rigidité et agissant comme première ligne de défense contre les ROS exogènes. L'ergostérol constitue un mécanisme de défense important pour *Leishmania* et l'interférence avec la biosynthèse des stérols aurait un impact sur sa survie. Une étude a démontré qu'une diminution significative de la viabilité cellulaire était mise en évidence après blocage de la synthèse des stérols via des inhibiteurs (Mathur et al., 2015).

Plusieurs travaux ont aussi démontré le rôle essentiel de l'ergostérol dans la croissance du parasite. En effet, après un traitement à la mévastatine, une diminution de 50% de la quantité d'ergostérol chez le parasite est observée tandis que cette diminution était réversible avec un apport en ergostérol exogène (Rodrigues et al., 2007).

*Partie II*  
*Matériels et Méthodes*



# *Étude 1 : Étude de l'impact des acides gras.*

## **1. Culture des parasites**

Deux isolats de souches humaines de *Leishmania infantum*, MON-1 responsable de la leishmaniose viscérale (LV) et MON-24 responsable de la leishmaniose cutanée (LC). La souche LV a été isolée à partir de la moelle osseuse ou de leucocytes sanguins et la souche CL a été isolée à partir de la sérosité cutanée. Des primocultures de promastigotes ont été réalisées en milieu biphasique Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) à 26 ° C avec repiquage toutes les semaines pendant 5 semaines consécutives. L'identification des isolats a été réalisée par électrophorèse des isoenzymes. Les deux souches ont été prélevées en Tunisie et le protocole a été revu et approuvé par le comité d'éthique de l'Institut Pasteur de Tunis.

Les promastigotes ont été cultivés à 26 ° C dans du milieu TC-199 (GE Healthcare, Pasching, Autriche) supplémenté avec 20% de sérum bovin fœtal et 100 ug / ml de pénicilline / streptomycine (Dutscher).

## **2. Cultures des macrophages**

La lignée cellulaire de macrophages de souris BALB / c J774A.1 (European Collection of Cell Culture) a été maintenue par passages successifs dans du milieu de culture RPMI-1640 (Dutscher) contenant 10% de sérum veau fœtal (SVF) (Dutscher St Quentin Fallavier, France), 25 µg / ml de nanomycopulitine (Dutscher) et 100 µg / ml de pénicilline / streptomycine (Dutscher). Les cultures ont été réalisées à 37 ° C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

## **3. Supplémentation des promastigotes avec les acides gras**

Des solutions éthanoliques mères d'AA et de DHA ont été préparées et diluées dans du RPMI sans sérum de veau fœtal à une concentration finale de 1 mM. Les promastigotes MON-1 et MON-24 ont été cultivés en milieu contenant 10% de SVF en l'absence (témoin) ou en présence d'acide gras différent à une concentration finale de 50 ou 100 µM avec une concentration finale en éthanol ne dépassant pas 0,1%. Le SVF a été abaissé à 10% pour réduire la quantité d'acides gras apportés par le sérum. Dans des conditions témoins, l'AA et le DHA libres ont donc été apportés à seulement 1,2 et 0,1 µM, respectivement, ce qui est négligeable par rapport aux conditions de supplémentation.

Aucun des acides gras n'a induit de toxicité cellulaire telle que vérifiée par une viabilité cellulaire  $\geq 95\%$  pour les deux souches (données non présentées). En outre, l'observation au microscope optique des promastigotes supplémentés a montré une mobilité et une morphologie normales par rapport aux parasites témoins. Après 24 h, les parasites ont été collectés par centrifugation (15 min, 1300 g) et soit stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour l'analyse des lipides, soit immédiatement utilisés pour infecter les macrophages.

#### **4. Analyse des acides gras des lipides totaux extraits des promastigotes**

La composition en AG des lipides totaux a été déterminée comme décrit précédemment (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017). Brièvement, les promastigotes ont été lysés dans 1 ml d'eau contenant 0,1 % de Triton X-100. Un volume d'hydroxytoluène butylé (BHT) dans de l'éthanol a été ajouté (50  $\mu\text{M}$  final) en tant qu'antioxydant. Les lipides totaux ont été extraits par la méthode modifiée de Bligh et Dyer (Bligh et Dyer, 1959) avec du chloroforme/méthanol à un rapport final de 2 : 2 : 1,8 (chloroforme/méthanol/eau, (v/v)). Les extraits lipidiques ont été séchés sous azote et les lipides totaux ont été transméthylés pendant 90 min à  $100^{\circ}\text{C}$  en utilisant du trifluorure de bore (Sigma, St-Quentin Fallavier, France). Les esters méthyliques d'acides gras (FAME) résultants ont été extraits par l'isooctane et analysés par GC en utilisant un système Hewlett-Packard équipé d'une colonne capillaire Supelco SP2380 (60 m x 0,22 mm) avec de l'hélium comme gaz vecteur. Les FAME ont été identifiés par comparaison avec des standards commerciaux. Les résultats ont été exprimés en pourcentage molaire de chaque acide gras individuel calculé à partir de la somme de tous les acides gras détectés prise comme 100 %.

#### **5. Analyse des métabolites oxygénés**

Les analyses des métabolites oxygénés ont été réalisées par la plateforme lipidomique de Toulouse.

Les promastigotes ont été cultivés dans du milieu TC-199 (GE Healthcare, Pasching, Autriche) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal et 100  $\mu\text{g/ml}$  de pénicilline / streptomycine (Dutscher) en l'absence ou en présence d'AA et de DHA à une concentration finale de 100  $\mu\text{M}$ . Après 24 heures, les parasites ont été recueillis par centrifugation (15 min, 2800 tr/min), lavés 3 fois avec du PBS et stockés à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour analyse.

Pour l'extraction, chaque parasite a été écrasé avec un instrument FastPrep®-24 (MP Biomedical) dans 0,5 mL de HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA). 300 µl de méthanol froid et 5 µl d'étalon interne (composés marqués au deutérium) ont été ajoutés. Après centrifugation à 900 g pendant 15 min à 4 ° C, les surnageants ont été transférés dans des plaques profondes de 2 ml à 96 puits et dilués dans de l'eau à 2 ml. Les échantillons ont ensuite été soumis à une extraction en phase solide (SPE) en utilisant une plaque à 96 puits OASIS HLB (30 mg / puits, Waters, St Quentin en Yvelines, France) prétraité avec MeOH (1 ml) et équilibrés avec 10% MeOH (1 ml). Après application de l'échantillon, la plaque d'extraction a été lavée avec 10% de MeOH (1 ml). Après séchage sous aspiration, les médiateurs lipidiques ont été élués avec 1 mL de MeOH. Avant l'analyse LC-MS / MS, les échantillons ont été évaporés sous azote gazeux et reconstitués dans 10 µL de MeOH.

Les analyses LC-MS / MS des eicosanoïdes ont été réalisées comme décrit (Le Faouder et al., 2013). En bref, les médiateurs lipidiques ont été séparés sur une colonne ZorBAX SB-C18 (2,1 mm, 50 mm, 1,8 µm) (Agilent Technologies) en utilisant le système HPLC Agilent 1290 Infinity (Technologies) couplé à un spectromètre de masse ESI-triple quadrupole G6460 (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Les données ont été acquises en mode de surveillance des réactions multiples (MRM) avec des conditions optimisées (optique ionique et énergie de collision). La détection des pics, l'intégration et l'analyse quantitative ont été effectuées à l'aide du logiciel d'analyse quantitative Mass Hunter (Agilent Technologies) basé sur des lignes d'étalonnage construites avec des étalons d'eicosanoïdes disponibles dans le commerce (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA).

## **6. Évaluation de l'infektivité des parasites**

### **a. Comptage des parasites intracellulaires**

Les macrophages ont étéensemencés dans du RPMI-1640 sur des lames de verre dans des plaques à 24 puits à une densité de 70 000 cellules par puits et cultivés à 37 ° C pendant 24 heures. Ils ont ensuite été incubés à raison de 30 parasites par cellule avec des parasites témoins ou supplémentés en acides gras. Au bout de 24 heures, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, fixées dans du paraformaldéhyde à 8% et colorées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Life Technologies, Paisley, UK). Les lames ont été observées par microscopie à fluorescence LEICA DM 4000B pour compter les cellules infectées et non infectées ainsi que les amastigotes intracellulaires.

Les données ont été analysées avec le logiciel LEICA Las 4.9. Pour chaque lame, témoin et traité, un total de 500 cellules a été compté dans plusieurs champs choisis au hasard. L'infectivité des parasites a été évaluée par le pourcentage de cellules infectées par rapport au nombre total de cellules comptées (taux d'infection) et par le nombre total d'amastigotes intracellulaires (charge parasitaire).

#### **b. Mesure des espèces réactives oxygénés dans les macrophages J774**

Les macrophages ont étéensemencés dans du RPMI-1640 dans des plaques à 24 puits à une densité de 70 000 cellules par puits et cultivés à 37 ° C pendant 24 heures. Ils ont ensuite été incubés à raison de 30 parasites par cellule avec des parasites témoins ou supplémentés en acides gras. Après 4 heures, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS. La production intracellulaire de ROS par les macrophages a été révélée avec la sonde intracellulaire H2DCFDA (Sondes moléculaires, Life Technologies) à 5 µM à 37 ° C avec 5% de CO2. Après 30 min d'incubation, les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS et l'intensité de fluorescence a été analysée sur un cytomètre en flux BD LSRII et les données ont été traitées avec les logiciels BD FACSDiva (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) et FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA). Les données sont exprimées comme le rapport de la fluorescence d'intensité moyenne (MFI) dans les macrophages infectés sur les macrophages non infectés ou comme le rapport de la MFI dans les macrophages infectés par des promastigotes supplémentés sur les macrophages infectés par des promastigotes témoins.

## *Étude 2 : Étude de l'impact du BMP.*

### **1. Préparation des liposomes**

Des liposomes composés de phosphatidylglycérol (PG) (Avanti Polar Lipids, Allabama) ont été préparés extemporanément à partir de solutions mère diluées à 10mg/ml dans du chloroforme. Deux types de PG ont été utilisés, le di18 :1-PG (DOPG) et le di16 :0-PG (DPPG). Un volume adéquat de PG est transféré dans un tube de verre et évaporé sous vide pendant 45 min. Le résidu lipidique a ensuite été dispersé dans 160 µl de solution de PBS (5 mM final) par vortex pendant 5 min à 4°C. Les liposomes multivésiculaires ont ensuite été soniqués pendant 15 min à 4°C pour fabriquer de petits liposomes.

### **2. Supplémentation des macrophages J774 en PG**

Les macrophages ont étéensemencés dans du RPMI-1640 dans des plaques à 24 puits à une densité de 70 000 cellules par puits et cultivés à 37 ° C. Après 24h, le milieu a été retiré et remplacé par du milieu témoin ou un milieu supplémenté en liposomes PG. Les différentes suspensions de liposomes PG ont été ajoutées dans le milieu de culture à des concentrations finales de 30 uM et incubées pendant 24h. A la fin de l'incubation, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS, grattées et culotées par centrifugation à 1000 tr/min. les culots cellulaires ont été congelés à -20°C jusqu'à l'analyse.

### **3. Infection des macrophages**

Les macrophages ont étéensemencés dans du RPMI-1640 sur des lames de verre dans des plaques à 24 puits à une densité de 70 000 cellules par puits et cultivés à 37 ° C. Après 24h, le milieu a été retiré et remplacé par du milieu témoin ou un milieu supplémenté en liposomes PG. Les différentes suspensions de liposomes PG ont été ajoutées dans le milieu de culture à des concentrations finales de 30 µM pendant 24h. Après ces 24h, le milieu a été retiré et remplacé une nouvelle fois par du milieu témoin ou supplémenté en liposomes PG aux mêmes concentrations pendant 24h.

L'infection a été évaluée à différents temps d'incubation et de mise en contact des promastigotes avec les macrophages. Ces différents temps correspondent à différents paramètres tels que l'association, l'infection et la survie. L'association est définie après 2h de mise en contact des promastigotes avec les macrophages, ce qui correspond à l'entrée du promastigote dans le macrophage. Ensuite, il y a une incubation pendant 24h des parasites avec les macrophages, qui correspond à la multiplication du parasite à l'intérieur du macrophage. Pour finir, la survie est évaluée, et dans ce cas, les macrophages sont infectés pendant 24h, lavés 2 fois avec du PBS et remis en culture pour 24h.

Les macrophages ont été incubés à raison de 10 parasites par cellule avec des promastigotes MON-1 ou MON-24. Après 2h et 24 heures d'infection, les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS, fixées dans du paraformaldéhyde à 4% et colorées avec du DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) (Life Technologies, Paisley, UK). Afin de déterminer la survie des promastigotes, les cellules ont été infectées pendant 24h, rincées 2 fois au PBS et les cultures ont été maintenues 24h supplémentaires dans les mêmes conditions que décrites précédemment. Ensuite celles-ci sont fixées puis colorées. Les lames ont été observées par microscopie à fluorescence LEICA DM 4000B pour compter les cellules infectées et non infectées ainsi que les amastigotes intracellulaires. Les données ont été analysées avec le logiciel LEICA Las 4.9. Pour chaque lamelle, un total de 500 cellules a été compté dans plusieurs champs choisis au hasard. L'infectivité des parasites a été évaluée par le pourcentage de cellules infectées par rapport au nombre total de cellules comptées (taux d'infection) et par le nombre total d'amastigotes intracellulaires (charge parasitaire).

#### **4. Analyse du BMP dans les macrophages et les promastigotes**

##### **a. Identification des espèces moléculaires du BMP par LC-MS**

Le dosage du BMP et du PG a été réalisé par LC-MS/MS à la Plateforme lipidomique fonctionnelle de l'INSA.

Un LC Agilent série 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) couplé à un spectromètre de masse hybride triple quadripôle 4000 QTRAP (AB SCIEX, Foster City, CA) a été utilisé pour quantifier les espèces individuelles BMP et PG.

Les lipides extraits ont été injectés sur une colonne C18 en phase inversée (CAPCELL PAK C18 MG III, 2,0 × 50 mm, Shiseido CO., LTD., Tokyo, Japon) et ont été élués avec un flux isocratique (100 l/ min) de méthanol : acétonitrile (90 :10) contenant 5 mmol/L de formiate d'ammonium et 0,1% d'acide formique. L'analyse MS a été effectuée en mode ion positif. Le mode de surveillance des réactions multiples (MRM) a été utilisé pour mesurer les espèces PG et BMP, contenant différentes chaînes acyles. Les teneurs en BMP et PG ont été calculées en reliant les aires de pic de chaque espèce à l'aire de pic de l'étalon interne correspondant (C14 :0/C14 :0-BMP ou C14 :0/C14 :0-PG) et la courbe standard de chaque étalon interne (0-20 pmol). L'acquisition et l'analyse des données ont été effectuées à l'aide du logiciel Analyst version 1.4.1 (AB SCIEX).

### **b. Immunofluorescence**

Des promastigotes MON-24 ont été étalés sur des lamelles de verre dans du milieu TC supplémenté avec 20 % de FBS et fixés avec du paraformaldéhyde à 4 % (p/v) pendant 15 min à température ambiante et bloqué avec de l'albumine de sérum bovin à 1 % (p/v) BSA-PBS pendant 30 min. Ils ont été incubés avec un anticorps primaire : anti-BMP (6C4) 1/10 dans 0,05% (w/v) de saponine pendant 1h, rincés trois fois avec du PBS puis avec un anticorps secondaire marqué à l'Alexa488 (Jackson ImmunoResearch Labs, ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) dans du BSA-PBS 1% (w/v) pendant 45 min à température ambiante. Les échantillons ont été observés avec un microscope à fluorescence LEICA DM4000 B et analysés à l'aide du logiciel LEICA Las V4.9 et au microscope à confocal Zeiss LSM 880 avec le logiciel Zen Black.

### **c. Microscopie à transmission**

Des macrophages J774 infectés par des promastigotes MON-1 ratio 10 :1 parasites par cellules ont été fixés avec 1 ml de cacodylate 0.2M (pH=7,4) et 1 ml de glutaraldéhyde 4% pendant 30 min à 4°C. Après lavage dans du cacodylate 0.2 M (pH=7,4) / saccharose 0.4M, les échantillons ont été post fixés dans 1ml d'osmium 2% et 1ml de cacodylate 0.3M (pH=7,4) pendant 45 minutes à 4°C et déshydratés de 30% à 100% éthanol.

Pour la microscopie électronique à transmission, des échantillons ont été imprégnés dans la résine épon pour la coupe. Après polymérisation à 60°C pendant 48h, des coupes minces ont été obtenues sur un ultramicrotome RMC MTX : des coupes semi-fines (1µm d'épaisseur) déposées sur des lames de verre ont été colorées avec du bleu de méthylène. Des coupes ultraminces (60-80 nm) adhérant à des grilles de cuivre ont été contrastées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb. Des coupes ont été observées en utilisant un microscope électronique à transmission Jeol 1200 CX équipé d'une caméra numérique SIS Megaview II. L'iconographie a été traitée avec le logiciel AnalySIS.



## *Partie III*

### *Résultats*

## *Étude 1 : Étude de l'impact des acides gras.*

Certains lipides, notamment les AGPI tels que l'AA et le DHA influencent les processus inflammatoires et modulent l'environnement oxydatif des cellules. Des travaux antérieurs du laboratoire ont démontré des changements dans la composition en acides gras des lipides dans deux souches de *L. donovani* lors de la différenciation de promastigote en amastigote, en particulier une augmentation des proportions de l'AA et du DHA.

Afin de mieux comprendre le rôle de ces acides gras chez le promastigote, nous avons étudié l'impact d'une supplémentation en AA ou en DHA sur des paramètres biochimiques tels que composition en acides gras des lipides et production des métabolites oxygénés chez les promastigotes ; ainsi que des paramètres fonctionnels tels que : l'infectivité par quantification des amastigotes intracellulaires et la réponse oxydative des macrophages J774. Cette étude a été réalisée dans deux souches de *L. infantum*, une viscérale, MON-1 et une cutanée MON-24.

Les conditions de supplémentation ont conduit à un enrichissement spécifique soit en AA soit en DHA des lipides du parasite et à une production accrue de métabolites oxygénés dérivés de ces acides gras. L'infectivité des promastigotes MON-1 et MON-24 supplémentés en AA, envers les cellules hôtes est plus élevée, comme le montre l'augmentation significative des amastigotes intracellulaires. La supplémentation en DHA s'accompagne d'une augmentation de l'infectivité de MON-24 contrairement à MON-1. Nos données montrent également une augmentation systématique de la production de ROS dans les macrophages infectés par MON-24 et MON-1. Cependant, une production similaire de ROS a été observée dans les macrophages infectés par des parasites supplémentés en AA ou en DHA par rapport aux témoins respectifs, suggérant que les ROS ne sont pas impliqués dans l'infectivité accrue des promastigotes supplémentés. Nous proposons que les effets de la supplémentation en acides gras AA et DHA sur l'infectivité des 2 souches de *L. infantum* pourraient résulter des effets régulateurs des métabolites oxygénés sur la réponse pro/anti-inflammatoire des macrophages

Les perspectives envisagées sont :

- Identifier le rôle précis des métabolites oxygénés dans l'infection
- Identifier la(les) classes de lipides les plus enrichies en AA ou DHA
- Comparer les profils inflammatoires du macrophage en dosant les cytokines produites par celui-ci après infection par des promastigotes contrôles et enrichis.

## Experimental Parasitology

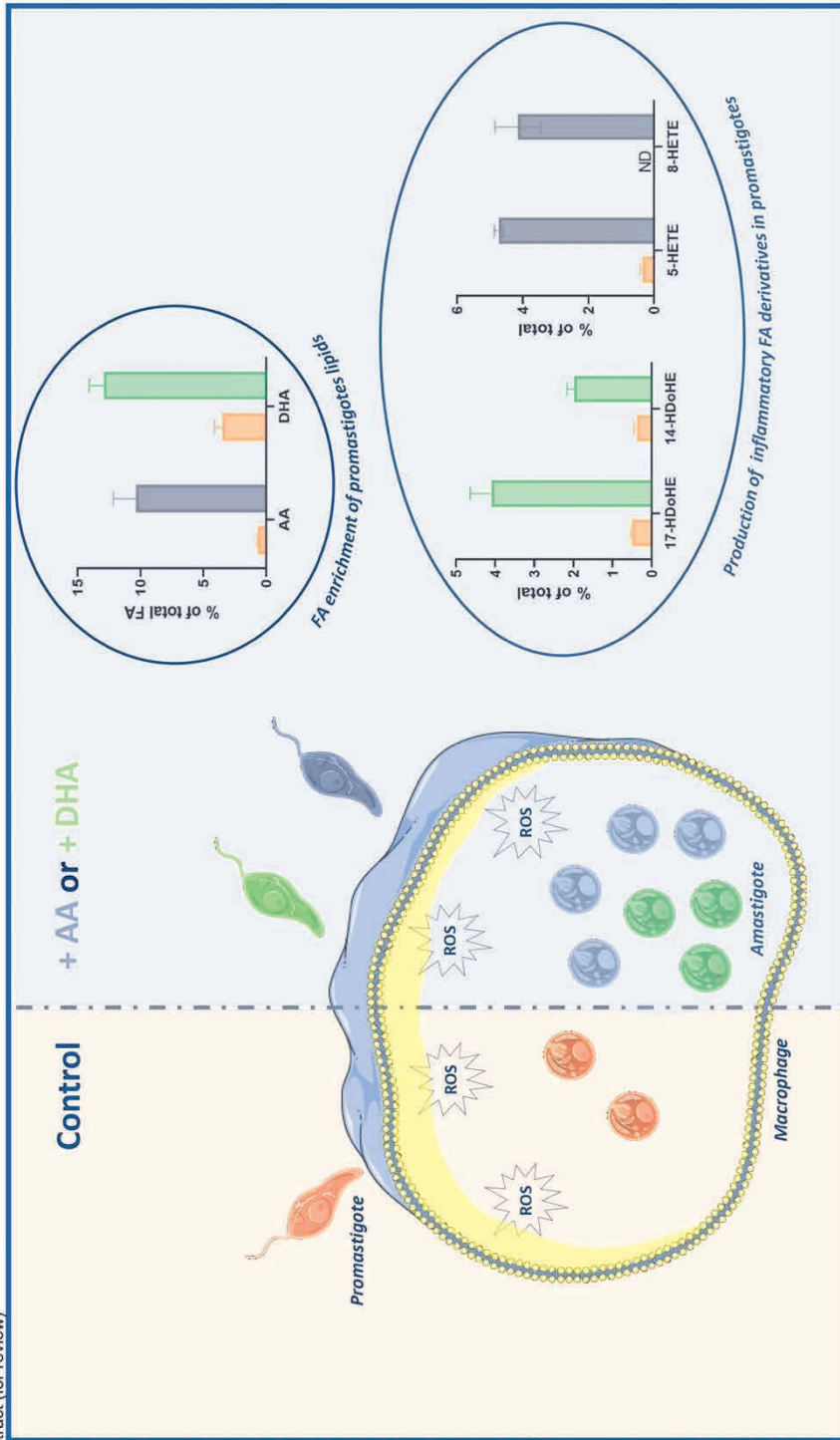
### Enrichment of Leishmania lipids with arachidonic or docosahexaenoic acids increases the production of lipid mediators and parasite infectivity towards cultured macrophages.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	EXPARA-D-21-00222R1
<b>Article Type:</b>	Research Paper
<b>Keywords:</b>	Leishmania infantum; macrophages; arachidonic acid; docosahexaenoic acid; reactive oxygen species; lipid mediators
<b>Corresponding Author:</b>	Isabelle DELTON, PhD Institut National des Sciences Appliquées de Lyon: Institut National des Sciences Appliquées de Lyon Villeurbanne, FRANCE
<b>First Author:</b>	Marine Leroux
<b>Order of Authors:</b>	Marine Leroux Hana Bouazizi Ben Messaoud Céline Luquain-Costaz Lars P. Jordheim Pauline Le Faouder Karim Aoun Philippe Lawton Samira Azzouz-Maache Isabelle DELTON, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>Leishmania parasites are the causative agents of visceral, mucocutaneous or cutaneous leishmaniasis in humans and of canine leishmaniosis. The macrophage is the predilected host cell of Leishmania. The fate of the parasite inside the host cell depends on the immune response of the macrophage, including inflammatory and oxidative reactions that promote parasite death. Some lipids, especially polyunsaturated fatty acids such as arachidonic (AA) and docosahexaenoic (DHA) acids, influence inflammatory processes and modulate the oxidative environment of cells. We have previously shown changes in the fatty acid composition of lipids in two strains of <i>L. donovani</i> upon differentiation of promastigote to amastigote, including increased proportions of AA and to a less extent of DHA. Here, we carried out fatty acid supplementation with AA or DHA on two <i>L. infantum</i> strains, a visceral (MON-1) and a cutaneous (MON-24), to evaluate the role of these fatty acids in parasite/macrophage interactions. The proportions of AA or DHA in total lipids were significantly increased in promastigotes cultured in AA- or DHA-supplemented media compared to controls. The production of fatty acid-derived oxygenated metabolites was enhanced in supplemented strains, generating inflammatory regulators, especially hydroxyeicosatetraenoic acids (5- and 8- HETE) from AA, and hydroxydocosahexaenoic acids (14- and 17-HoDHE) from DHA. For both MON-1 and MON-24, AA-supplemented promastigotes showed higher infectivity towards J774 macrophages as evidenced by higher intracellular amastigote numbers. Higher infectivity was observed after DHA supplementation for the MON-24 but not the MON-1 strain. ROS production by macrophages increased upon parasite infection, but no significant difference was observed between control and supplemented parasites. We propose that AA or DHA enrichment of promastigote lipids promote the production of inflammatory regulators that modulate parasite infectivity.</p>
<b>Response to Reviewers:</b>	

## HIGHLIGHTS

- Supplementation of *L. infantum* promastigotes with arachidonic or docosahexaenoic acids led to a specific fatty acid enrichment of total lipids in both visceral and cutaneous strains
- The production of lipid inflammatory mediators is increased in AA and DHA supplemented promastigotes
- AA enrichment is associated with higher infectivity towards macrophages in both cutaneous and visceral strains
- DHA enrichment is associated with higher infectivity in cutaneous but not visceral strain
- ROS production is increased in infected macrophages independent of fatty acid enrichment



1 **Enrichment of *Leishmania* lipids with arachidonic or docosahexaenoic acids increases the**  
2 **production of lipid mediators and parasite infectivity towards cultured macrophages.**

3

4 **Marine Leroux<sup>1</sup>, Hana Bouazizi-Ben Messaoud<sup>1</sup>, Céline Luquain-Costaz<sup>1,2</sup>, Lars P.**  
5 **Jordheim<sup>3</sup>, Pauline Le Faouder<sup>4</sup>, Karim Aoun<sup>5</sup>, Philippe Lawton<sup>1</sup>, Samira Azzouz-**  
6 **Maache<sup>1</sup> and Isabelle Delton<sup>1,2</sup>**

7

8 <sup>1</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, Villeurbanne,  
9 France

10 <sup>2</sup> INSA-Lyon, Villeurbanne, France

11 <sup>3</sup> Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm 1052, CNRS 5286, Centre Léon  
12 Bérard, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, Lyon, France

13 <sup>4</sup> MetaToul-Lipidomic Core Facility, MetaboHUB, I2MC Inserm U1048, Toulouse, France

14 <sup>5</sup> University Tunis El Manar, Pasteur Institute of Tunis, LR 11-IPT-06 Laboratory of Medical  
15 Parasitology, Biotechnology and Biomolecules, Tunis, Tunisia

16

17 Corresponding author: Isabelle Delton

18 LAGEPP, 8 avenue Rockefeller, 69008 Lyon

19 E-mail address: [isabelle.delton@insa-lyon.fr](mailto:isabelle.delton@insa-lyon.fr)

20

21

22

23

24

25 **ABSTRACT**

26

27 *Leishmania* parasites are the causative agents of visceral, mucocutaneous or cutaneous  
28 leishmaniasis in humans and of canine leishmaniosis. The macrophage is the predilected host  
29 cell of *Leishmania*. The fate of the parasite inside the host cell depends on the immune response  
30 of the macrophage, including inflammatory and oxidative reactions that promote parasite death.  
31 Some lipids, especially polyunsaturated fatty acids such as arachidonic (AA) and  
32 docosahexaenoic (DHA) acids, influence inflammatory processes and modulate the oxidative  
33 environment of cells. We have previously shown changes in the fatty acid composition of lipids  
34 in two strains of *L. donovani* upon differentiation of promastigote to amastigote, including  
35 increased proportions of AA and to a less extent of DHA. Here, we carried out fatty acid  
36 supplementation with AA or DHA on two *L. infantum* strains, a visceral (MON-1) and a  
37 cutaneous (MON-24), to evaluate the role of these fatty acids in parasite/macrophage  
38 interactions. The proportions of AA or DHA in total lipids were significantly increased in  
39 promastigotes cultured in AA- or DHA-supplemented media compared to controls. The  
40 production of fatty acid-derived oxygenated metabolites was enhanced in supplemented strains,  
41 generating inflammatory regulators, especially hydroxyeicosatetraenoic acids (5- and 8- HETE)  
42 from AA, and hydroxydocosahexaenoic acids (14- and 17-HoDHE) from DHA. For both MON-  
43 1 and MON-24, AA-supplemented promastigotes showed higher infectivity towards J774  
44 macrophages as evidenced by higher intracellular amastigote numbers. Higher infectivity was  
45 observed after DHA supplementation for the MON-24 but not the MON-1 strain. ROS  
46 production by macrophages increased upon parasite infection, but no significant difference was  
47 observed between control and supplemented parasites. We propose that AA or DHA enrichment  
48 of promastigote lipids promote the production of inflammatory regulators that modulate  
49 parasite infectivity.

50

51 **Keywords:** *Leishmania infantum*, macrophages, arachidonic acid, docosahexaenoic acid,  
52 reactive oxygen species, lipid mediators

53

## 54        **1. Introduction**

55

56        Leishmaniases are a complex of tropical and sub-tropical human diseases caused by  
57 unicellular parasites of the genus *Leishmania* transmitted by a sand-fly vector and displaying  
58 various clinical expressions (*i.e.* cutaneous, muco-cutaneous and visceral). The *Leishmania* life  
59 cycle involves two different stages: the promastigote inside the insect vector and the amastigote  
60 in the vertebrate's macrophages. The promastigotes inoculated by the vector are internalized by  
61 host macrophages via phagocytosis and undergo a transformation into the amastigote stage  
62 within a parasitophorous vacuole of phagolysosomal origin. The survival of the parasite in the  
63 host, in these two forms, is closely related to the immune status of the host and the ability of  
64 the parasite to escape to the host defenses. Numerous promastigotes are lysed by the host  
65 complement system. Non-lysed promastigotes are phagocytosed by macrophages and  
66 differentiate into amastigotes that multiply and survive. Macrophages play a primary role in the  
67 innate inflammatory response against the parasite, involving what is defined as the concept of  
68 classical and alternative activation, orchestrated respectively by the so-called M1 and M2  
69 macrophages. The M1 phenotype is characterized by the secretion of pro-inflammatory  
70 cytokines and microbicidal molecules (Covarrubias *et al.*, 2013; Martinez and Gordon, 2014,  
71 *p.* 2) whereas the M2 phenotype exhibits anti-inflammatory properties (Martinez and Gordon,  
72 2014; Parisi *et al.*, 2018). During *Leishmania* infection, host macrophages can undergo both  
73 M1 and M2 activation, leading respectively to killing or survival of the parasite. The balance  
74 of macrophage polarization in leishmaniasis is not fully understood but could depend on the  
75 *Leishmania* species and the time of infection (Tomiotto-Pellissier *et al.*, 2018).

76        The role of lipids in macrophage polarization during infection with trypanosomatids has  
77 recently aroused growing interest. It was reported that lipid extracts from *Trypanosoma cruzi*  
78 amastigotes induced a pro-inflammatory response in murine peritoneal macrophages, as  
79 evidenced by increased formation of lipid bodies, COX2 expression, TNF-alpha secretion, and  
80 NO release (Bott *et al.*, 2018). Similarly, lipid extracts from *L. braziliensis* amastigotes were  
81 shown to favor M1 macrophage polarization relative to the M2 phenotype whereas  
82 promastigotes conversely favored the M2 phenotype with increased arginase activity, IL10  
83 secretion and M2 mRNA markers (Carfagna *et al.*, 2020).

84        Among lipids responsible for the regulation of immune response, fatty acids (FA) and  
85 especially polyunsaturated FA (PUFA) are potential candidates. It is well known that PUFA  
86 play a key role in inflammatory processes and their resolution through the production of lipid  
87 mediators, the interaction with cell surface receptors or the regulation of inflammatory gene



88 expression. In mammalian cells, AA is well known as the precursor of pro-inflammatory  
89 mediators while DHA is conversely converted into pro-resolving derivatives (Innes and Calder,  
90 2018; Marion-Letellier et al., 2015). PUFA derivatives have been involved in host response to  
91 infection with *Trypanosoma* or *Leishmania* parasites (9). It was also demonstrated that these  
92 parasites were able to produce both pro-inflammatory and pro-resolving mediators, thereby  
93 modulating macrophage responses to parasite infection (Colas et al., 2018; López-Muñoz et  
94 al., 2018; Machado et al., 2011; Paloque et al., 2019). PUFA, such as AA and DHA, are also  
95 known to be highly sensitive to oxidative stress due to their unsaturation level generating lipid  
96 peroxides, that are themselves a source of reactive oxygen species (ROS) and can initiate cell  
97 death (Su et al., 2019). Several studies have reported an increase of ROS production in  
98 macrophages during early stage of *Leishmania* infection most likely as a defence mechanism  
99 by inducing parasite killing (Carneiro et al., 2016a; Deschacht et al., 2012; Gantt et al., 2001).  
100 We recently highlighted some FA specificities in lipids from *L. infantum* and *L. donovani*  
101 promastigotes, especially regarding PUFA, with a relative abundance of DHA compared to very  
102 low proportion of AA, which is the opposite of what is usually observed in mammalian cells.  
103 Of interest, we showed that AA content was specifically increased in amastigotes isolated from  
104 infected macrophages compared to promastigotes, supporting a functional role of this fatty acid  
105 during parasite infection and/or intracellular survival (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017).

106 The present study was undertaken to better understand the role of AA and DHA during  
107 parasite infection with a focus on metabolic aspects. We therefore examined the effects of a  
108 specific supplementation with AA or DHA on lipid FA composition and FA oxygenated  
109 metabolism in *Leishmania* promastigotes, as well as the impact in terms of parasite infectivity  
110 and ROS production in infected macrophages. We used two strains of *L. infantum*, one isolated  
111 from a patient with visceral leishmaniasis (MON-1) and one isolated from a lesion of a patient  
112 with cutaneous leishmaniasis (MON-24).

113

114

## 115 2. Materials and methods

116

### 117 2.1. Parasite strains and culture

118 Two isolates of *L. infantum* human strains, causing VL (MON-1) or CL (MON-24) were  
119 used in this study. The strains were initially isolated as part of the routine diagnostic (culture)  
120 procedure recommended by WHO for VL and CL samples. They were anonymized, archived  
121 and cryopreserved in the biobank of the Parasitology department of the Pasteur Institute at

122 Tunis. No personal data was used. The VL strains were isolated from the bone marrow or blood  
123 leukocytes and the CL strains were isolated from dermal serosity as described (Chouihhi et al.,  
124 2009). Primo-cultures of promastigotes were performed in biphasic Novy-MacNeal-Nicolle  
125 (NNN) medium at 26 °C with subculture every week for 5 consecutive weeks. Identification of  
126 isolates was performed by isoenzyme electrophoresis (Rioux et al., 1990).  
127 Promastigotes were cultured at 22 °C in TC-199 medium (GE Healthcare, Pasching, Austria)  
128 supplemented with 20% fetal bovine serum and 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Dutscher,  
129 Issy-les-Moulineaux, France). The parasites were cultured in 75-cm<sup>2</sup> culture flasks and were  
130 harvested during their exponential growth phase by centrifugation at 1300 g for 15 min. The  
131 parasite pellet was washed 3 times with 10 ml of PBS and before lipids analysis a total protein  
132 assay was performed with the Bradford method.

133

#### 134 2.2. Macrophage culture

135 The BALB/c mice macrophage cell line J774A.1 (European Collection of Cell Culture) was  
136 maintained by successive passages in RPMI-1640 culture medium (Dutscher) containing 10%  
137 (v/v) foetal bovine serum (FBS) (Sigma, St-Quentin Fallavier, France), 25 µg/ml  
138 nanomycopulitine and 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Dutscher). Cultures were performed  
139 at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>.

140

#### 141 2.3. Supplementation of promastigotes with fatty acids

142 Stock ethanolic solutions of AA and DHA were prepared and diluted in RPMI without FBS  
143 at a final concentration of 1 mM. Promastigotes (MON-1 and MON-24 strains) were cultured  
144 in medium containing 10% FBS with addition (supplemented) or without addition (control)  
145 of AA or DHA at a final concentration of 50 or 100 µM with a final ethanol concentration not  
146 exceeding 0.1%. FBS was lowered to 10% to reduce the quantity of fatty acids supplied by  
147 serum. The amounts of free fatty acids (unesterified) and total fatty acids (unesterified +  
148 esterified in glycerolipids) provided by the serum are detailed in supplementary Table 1. In  
149 control conditions, free AA and DHA were thus supplied at only 1.2 and 0.1 µM, respectively,  
150 which is negligible compared to supplemented conditions. After 24 h, the parasites were  
151 collected by centrifugation (15 min, 1300 g) and either stored at -20 °C for lipid analysis or  
152 immediately used to infect macrophages. Before macrophage infection, parasite viability was  
153 determined using (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3carboxymethoxyphenyl)-2-(4-  
154 sulfophenyl)-2H-tetrazolium inner salt)/phenazine methosulfate (MTS/PMS) solution  
155 (CellTiter 96<sup>®</sup>; Aqueous Non-radioactive cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA).

156 The absorbance of the formazan product was measured at 490 nm with a plate reader (Thermo  
157 Fisher Scientific 51118177 Multiskan EX Microplate Photometer, Villebon sur Yvette,  
158 France). None of the added FA induced cell toxicity as verified by viability  $\geq 95\%$  for both  
159 strains (data not shown). Furthermore, optical microscopic observation of supplemented  
160 promastigotes showed normal mobility and morphology compared to control parasites.

161

#### 162 2.4. Evaluation of parasite infectivity

163 Macrophages were seeded in RPMI-1640 on glass slides in 24 well plates at a density of  
164 70,000 cells per well and cultured at 37 °C for 24 hours. They were then incubated at a ratio  
165 of 30 parasites per cell with control or supplemented parasites. After 24 h, cells were washed 3  
166 times with PBS, fixed in paraformaldehyde 8% and stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-  
167 phenylindole) (Life Technologies, Paisley, UK). The slides were observed by fluorescence  
168 microscopy to count infected and non-infected cells as well as intracellular amastigotes. For  
169 each slide, a total of 500 cells were observed in 2 randomly selected fields. Parasite infectivity  
170 was evaluated by the percentage of infected cells to total counted cells (infection rate) and by  
171 the total number of intracellular amastigotes (parasite load) following macrophage exposure  
172 to control or supplemented promastigotes.

173

#### 174 2.5. Measurement of ROS production

175 Macrophages were seeded in RPMI-1640 in 24 well plates at a density of 70,000 cells per well  
176 and cultured at 37 °C for 24 h. Conditions of macrophage infection with *Leishmania*  
177 promastigotes (parasite/cell ratio, incubation time) were optimized in order to improve ROS  
178 production. Unless otherwise indicated, macrophages were incubated at a ratio of 30 parasites  
179 per cells with control or supplemented parasites. After 4 h, cells were washed 3 times with PBS.  
180 Intracellular ROS production by macrophages was revealed with the intracellular probe  
181 H2DCFDA (Molecular probes, Life Technologies) at 5  $\mu\text{M}$  at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub>. After 30  
182 min incubation, cells were washed twice with PBS and the fluorescence intensity was analysed  
183 on BD LSRII flow cytometer and data processed with BD FACSDiva (BD Biosciences, San  
184 Diego, CA, USA) and FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA) software. Data are expressed as  
185 the ratio of the mean intensity fluorescence (MFI) in infected macrophages over non-infected  
186 macrophages or as the ratio of the MFI in macrophages infected with supplemented  
187 promastigotes over macrophages infected with control promastigotes.

#### 188 2.6. Fatty acid analysis of total lipids

189 FA composition of total lipids was determined as previously described (Bouazizi-Ben  
190 Messaoud et al., 2017). Briefly, promastigotes were lysed in 1 ml water containing 0.1% Triton  
191 X-100. Ten  $\mu$ l of butylated hydroxytoluene in ethanol (50  $\mu$ M final) was added as an  
192 antioxidant. Total lipids were extracted by the modified Bligh and Dyer method (Bligh and  
193 Dyer, 1959) with chloroform/methanol at a final ratio of 2:2:1.8 (chloroform/methanol/water,  
194 (v/v)). Lipid extracts were dried under nitrogen and total lipids were transmethylated for 90 min  
195 at 100 °C using boron trifluoride (Sigma, St-Quentin Fallavier, France). The resulting fatty acid  
196 methyl esters (FAME) were extracted by isooctane and analysed by GC using a Hewlett-  
197 Packard system equipped with a Supelco SP2380 capillary column (60 m x 0.22 mm) with  
198 helium as a carrier gas. FAME were identified by comparison with commercial standards.  
199 Results were expressed as molar percentage of each individual fatty acid calculated from the  
200 sum of all detected fatty acids taken as 100%.

201

#### 202 *2.7. Analysis of fatty acid-derived oxygenated metabolites*

203 Promastigotes were cultured in TC-199 medium (GE Healthcare, Pasching, Austria)  
204 supplemented with 10% fetal bovine serum and 100  $\mu$ g/ml Penicillin/Streptomycin (Dutscher)  
205 in the absence or presence of AA and DHA at a final concentration of 100  $\mu$ M. After 24 h, the  
206 parasites were collected by centrifugation (15 min, 1300 g), washed 3 times with PBS, and  
207 stored at -20°C for analysis. For extraction, parasites were crushed with a FastPrep<sup>®</sup>-24  
208 Instrument (MP Biomedical, Santa Ana, CA) in 0.5 ml of HBSS (Invitrogen, Carlsbad, CA,  
209 USA). 300  $\mu$ l of cold methanol and 5  $\mu$ l of internal standard (Deuterium labeled compounds)  
210 were added. After centrifugation at 900 g for 15 min at 4 °C, supernatants were transferred into  
211 2 ml 96-well deep plates and diluted in H<sub>2</sub>O to 2 ml. Samples were then submitted to solid  
212 phase extraction (SPE) using OASIS HLB 96-well plate (30 mg/well, Waters, St Quentin en  
213 Yvelines, France) pretreated with MeOH (1 ml) and equilibrated with 10% MeOH (1 ml). After  
214 sample application, extraction plate was washed with 10% MeOH (1 ml). After drying under  
215 aspiration, lipids mediators were eluted with 1 ml of MeOH. Prior to LC-MS/MS analysis,  
216 samples were evaporated under nitrogen gas and reconstituted in 10  $\mu$ l on MeOH.

217 LC-MS/MS analyses of FA derivatives were performed as described (Le Faouder et al., 2013).  
218 Briefly, lipid mediators were separated on a ZorBAX SB-C18 column (2.1 mm, 50 mm, 1.8  
219  $\mu$ m) (Agilent Technologies) using Agilent 1290 Infinity HPLC system coupled to an ESI-triple  
220 quadruple G6460 mass spectrometer (Agilent Technologies Les Ulis, France). Data were  
221 acquired in Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with optimized conditions (ion optics  
222 and collision energy). Peak detection, integration and quantitative analysis were done using

223 Mass Hunter Quantitative analysis software (Agilent Technologies) based on calibration lines  
224 built with commercially available eicosanoids standards (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI,  
225 USA).

226

### 227 3. Results

228

#### 229 3.1. Effect of fatty acid supplementation on total lipid composition in promastigotes

230 The whole FA compositions of total lipids from the two *Leishmania* strains are reported in  
231 Table 1. In control conditions, both strains contained about 30% saturated fatty acids (SFA),  
232 40% monounsaturated fatty acids (MUFA) and 30% polyunsaturated fatty acids (PUFA), with  
233 the n-6 fatty acids being more abundant than the n-3 fatty acids. Consistent with previous  
234 observations (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017), AA proportion was very low representing  
235 less than 1% of total FA in both strains compared to DHA proportion accounting for 3 and 6%  
236 of total FA in MON-1 and MON-24, respectively.

237 As expected, the FA composition of both strains was modified according to the FA added to  
238 the culture medium. AA proportion was increased by 16- and 6.5-fold in MON-1 and MON-24  
239 respectively after supplementation with 50  $\mu$ M AA, without significant changes of the  
240 proportions of other n-6 fatty acids. The supplementation with 50  $\mu$ M DHA led to an increase  
241 of DHA proportion by about 4- and 2-fold in MON-1 and MON-24, respectively. Other n-3  
242 PUFA namely 22:5n-3 and 20:5n-3 were slightly increased in MON-1, which was not the case  
243 in MON-24. The proportions of C-18 fatty acids, especially 18:0 and 18:1n-9 that are among  
244 major FA in non-supplemented parasites, were decreased after both AA and DHA  
245 supplementation in MON-1 but not or only slightly decreased in MON-24.

246 Altogether, these data indicate that changes in FA composition after AA or DHA  
247 supplementation are more pronounced in MON-1 than in MON-24. They also suggest no  
248 retroconversion or elongation of AA, and only slightly for DHA in MON-1.

249

#### 250 3.2. Fatty acid-derived oxygenated metabolites

251 We then evaluated the consequences of the specific AA or DHA enrichment of promastigote  
252 lipids on the production of FA oxygenated derivatives. As shown in Figure 1, linoleic acid (LA)  
253 derivatives were recovered in both MON-1 and MON-24 promastigotes grown in control  
254 conditions, whereas AA and DHA derivatives were not detected or less than 1% of total. The  
255 proportion of total AA derivatives was markedly increased after AA supplementation at the

256 expense of LA derivatives, the increase being more pronounced in MON-24 than in MON-1  
257 strain. DHA supplementation was associated with an increase of total DHA derivatives  
258 similarly in both strains. The distributions of major metabolites are detailed in Table 2. In  
259 promastigotes supplemented with AA, significant increase was observed for both epoxy- and  
260 hydroxyl- derivatives as follows: 11, 12-EET  $\approx$  5-HETE  $\approx$  8-HETE > 14, 15-EET > 15-HETE  
261 > PGE2  $\approx$  PGD2, in the same range of order in both strains, but at twice higher proportion in  
262 MON-24 compared to MON-1 strain. Promastigotes supplemented with DHA showed  
263 increased proportion of 17-HDoHE > 14-HDoHE, at similar levels in MON-1 and MON-24.

264

### 265 *3.3. Effect of fatty acid supplementation on promastigote infectivity to cultured* 266 *macrophages*

267 The functional impact of FA supplementation was then evaluated on promastigote infectivity  
268 towards J774 macrophages as indexed by infection rate and parasite load. As an illustration,  
269 figure 2A shows infected and not infected macrophages (infection rate) and intracellular  
270 amastigotes (parasite load) after incubation with control or supplemented MON-1  
271 promastigotes.

272 For both strains, the infection rate was about 40-60% of total macrophages after exposure  
273 with control promastigotes. No significant change was observed with AA- or DHA-  
274 supplemented promastigotes (Figure 2A and data not shown). As shown in Figure 2B, parasite  
275 load in macrophages infected with AA-supplemented parasites was increased by 20% and 40%  
276 for MON-1 and MON-24 respectively, when compared to macrophages infected with control  
277 parasites. Parasite load was increased by 30 % after infection with DHA-supplemented MON-  
278 24 parasites while no significant difference was observed with DHA-supplemented MON-1  
279 parasites.

280

### 281 *3.4. ROS production*

282 It has been widely reported that AA or DHA supplementation of cultured cells favours ROS  
283 production as these PUFA are highly sensitive to peroxidation (Su et al., 2019). We therefore  
284 examined the impact of FA supplementation of promastigotes on their ability to elicit ROS  
285 production in macrophages.

286 As shown in figure 3, ROS production elicited by MON-1 and MON-24 parasites in  
287 macrophages was the highest with the ratio 30:1 (number of parasites per cell, 3A) and for  
288 exposure time from 3 to 6h (3B). The impact of FA supplementation on ROS production was  
289 then examined at a ratio 30:1 after 4h infection. ROS levels were slightly increased in

290 macrophages infected with MON-24 promastigotes supplemented with AA at 50  $\mu$ M and 100  
291  $\mu$ M (3C, 3E). The same trend to increase was observed with AA-supplemented MON-1 without  
292 reaching statistical significance (3C, 3D). DHA supplementation had no impact on ROS  
293 production whatever the concentration and the strain (3C, 3D, 3E). Together these data show  
294 no or only minor change in ROS production in macrophages following infection with  
295 supplemented vs. control parasites.

296

#### 297 **4. Discussion**

298

299 It is well known that immunity is conditioned by the cellular and tissue environment and  
300 that cells of the immune system, and especially macrophages, adapt to environmental  
301 challenges. The role of certain lipids in macrophage activation has been reported, however less  
302 is known about their role in oxidation and inflammation processes in the activation of  
303 *Leishmania* infected macrophages. Our present data suggest that infectivity of two *L. infantum*  
304 strains, one cutaneous and one visceral, can be modulated by FA available in their environment.  
305 Both MON-1 and MON-24 promastigotes supplemented with AA showed increased infectivity  
306 towards host cells *in vitro*, whereas DHA supplementation increased infectivity only in MON-  
307 24 strain. These changes of parasite infectivity were associated with an enrichment of parasite  
308 lipids with the supplemented FA, as well as increased production of AA- and DHA-oxygenated  
309 metabolites.

310

311 The enrichment in AA or DHA of promastigote lipids after FA supplementation supports the  
312 concept that trypanosomatids, including some *Leishmania* species are able to scavenge lipids  
313 from their host environment. Plasma lipoproteins such as low density lipoproteins have been  
314 described as an important source of FA supplied as cholesterol esters and phospholipids through  
315 internalization processes (Coppens et al., 1995; De Cicco et al., 2012). In addition, exogenous  
316 free FA are efficiently salvaged by trypanosomatids (Berman et al., 1987; Voorheis, 1980).  
317 Orthologues of human fatty acid transport protein (FATP) have been identified in the genome  
318 of *L. major* and several studies have suggested the presence of fatty acid binding proteins  
319 (FABP) and FATP that would be involved in the specific uptake of FA in *Leishmania* parasites  
320 (Maache et al., 2005; Uttaro, 2014). Likewise, our present data support the hypothesis that free  
321 FA are efficiently taken up by the promastigote forms of *Leishmania*. In control culture  
322 condition, exogenous FA are mostly provided by lipoprotein-associated lipids from serum and  
323 FA composition of parasite lipids reflect to some extent the availability of FA in serum

324 (supplementary Table 1). For instance, C-18 FA which are abundant in serum especially 18:0  
325 and 18:1n-9, were recovered in high proportions in cultured promastigotes. However, despite  
326 its high proportion in serum, 16:0 was rather low in cultured promastigotes and AA which  
327 represents the major PUFA in serum was the lowest one in cultured promastigotes. These  
328 discrepancies together with the efficient uptake of free AA and DHA in the supplementation  
329 conditions suggest that *Leishmania* promastigotes efficiently take up fatty acid supplied in the  
330 free form. Besides the machinery for the uptake of exogenous FA, trypanosomatids are able to  
331 synthesize FA *de novo*. The genome of *L. major* encodes FA synthase, elongases and  
332 desaturases for *de novo* synthesis of saturated, monounsaturated and polyunsaturated FA,  
333 including stearoyl CoA desaturase that initiates the conversion of 18:0 into 18:1n-9 and other  
334 desaturases for up to C-22 PUFA synthesis (Lee et al., 2007; Uttaro, 2014). In both strains, AA  
335 supplementation led to an increase of AA proportion with no significant change of other n-6  
336 FA, in particular longer chain 22:4 n-6 or shorter chain 20:3n-6, indicating low  
337 elongation/retroconversion rate. DHA supplementation was associated to an increased  
338 proportion of DHA in both strains, as well as a moderate retroconversion of DHA into 22:5n-3  
339 in MON-1 but not in MON-24. These differences suggest that although n-3 and n-6 FA share  
340 enzymatic pathways for *de novo* synthesis in *Leishmania* (Lee et al., 2007), they undergo  
341 distinct metabolism in promastigotes, with differences between parasite strains.

342

343 Long chain PUFA such as AA and DHA have been widely reported to induce cellular  
344 oxidative stress. Likewise, exogenously added AA and DHA were shown to promote ROS  
345 production in *L. donovani* promastigotes (Mathur et al., 2015). The production of ROS has been  
346 observed in macrophages infected with *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, most likely as a defence  
347 mechanism to eliminate parasites (Carneiro et al., 2016b; Reybier et al., 2010; Roma et al.,  
348 2016; Thomazelli et al., 2018). Our data consistently show increased ROS production in both  
349 MON-24 and MON-1 infected macrophages. However, similar ROS production was observed  
350 in macrophages infected with AA- or DHA- supplemented parasites compared to respective  
351 controls, suggesting that ROS are not involved in the increased parasite infectivity of  
352 supplemented promastigotes.

353

354 Noteworthy, we previously reported a significant increase of AA in parasite lipids upon  
355 differentiation of *L. donovani* promastigotes to intramacrophagic amastigotes (Bouazizi-Ben  
356 Messaoud et al., 2017). Our present findings that AA enrichment of promastigotes increased  
357 intracellular parasite load also support a role of AA in the infection process. One may however



358 notice that the increase of parasite infectivity was slightly higher for MON-24 than MON-1  
359 whereas AA enrichment and changes in FA composition of total lipids were more pronounced  
360 in MON-1 than in MON-24. This suggests that increased infectivity of AA-supplemented  
361 parasite is independent or only partly dependent of changes in FA composition of parasite  
362 lipids. Among alternative hypothetic mechanisms, AA could be incorporated in specific  
363 membrane glycerophospholipids/membrane domains, thereby modulating membrane receptor  
364 environment and interaction with host cells (Marion-Letellier et al., 2015). Besides, AA is well  
365 known in mammalian cells as the precursor of pro-inflammatory mediators while DHA is  
366 conversely converted into pro-resolving derivatives. Of interest, it has been shown that several  
367 *Leishmania* species including *L. infantum* were able to convert AA into prostaglandins PGE<sub>2</sub>,  
368 PGD<sub>2</sub> and PGF<sub>2α</sub> (Araujo-Santos et al., 2014; Kabututu et al., 2003). PGF<sub>2α</sub> produced by *L.*  
369 *infantum* is important during its development into the infective metacyclic stage and increases  
370 the parasite burden (Araujo-Santos et al., 2014). Moreover, PGE<sub>2</sub> produced by host cell  
371 macrophages promotes the survival of *L. donovani* by inhibition of the host's immune response  
372 (Saha et al., 2014). More recently, an extensive study compared the profiles of proinflammatory  
373 and proresolving mediators in non-infectious (procyclic) and infectious (metacyclic)  
374 *Leishmania* promastigotes, revealing that specific AA metabolites were increased in the  
375 metacyclic form (Paloque et al., 2019). Noteworthy, major changes were observed for 8-HETE  
376 which is also the major metabolite recovered in AA supplemented promastigotes together with  
377 5-HETE and EET. In addition, the higher production of these metabolites in MON-24 correlates  
378 with the higher increase of infectivity compared to in MON-1.

379 Regarding DHA, an increase in parasite infectivity was observed in MON-24 but not MON-1  
380 after DHA supplementation, while DHA enrichment and changes in FA composition were  
381 conversely less pronounced in MON-24 than MON-1. Again, this suggests that increased  
382 infectivity of DHA supplemented parasite is independent or only partly dependent of DHA  
383 enrichment and changes in FA acid composition of parasite lipids. However, the production of  
384 DHA oxygenated metabolites 14-and 17-HDoHE was higher in MON-24 than in MON-1.  
385 HDoHE are the precursors of proresolving mediators (*i.e.* maresins and resolvins). Of interest,  
386 Paloque et al. (Paloque et al., 2019) highlighted the elevated production of HdoHE in  
387 metacyclic promastigotes and showed that the exposure of macrophages with the lipids extracts  
388 of infectious promastigotes containing both AA and DHA derivatives induced the production  
389 of proresolving mediators in macrophages, and their polarization into M2 phenotype. We  
390 therefore propose that enrichment of promastigote lipids with AA or DHA could modulate  
391 parasite infectivity through the production of bioactive oxygenated metabolites, especially

392 HETE and HdoHE. Other mechanisms not explored in our study like FA esterification in  
393 specific lipid pools/lipid molecular species, FA interaction with specific gene expression and/or  
394 interaction with membrane receptors may however be also considered.

395

396 Altogether, our data indicate that *Leishmania* infectivity may be modulated by exogenous  
397 fatty acids, through complex mechanisms depending on the *Leishmania* strains and FA. Further  
398 investigations will be needed to confirm the involvement of oxygenated metabolites and explore  
399 other potential mechanisms including changes in FA composition of specific cellular lipids, and  
400 regulation of oxidative and inflammatory status in infected macrophages. We observed  
401 differences between the two studied strains, although not always very significant, but this shows  
402 that the response to infection may depend on the promastigotes causing the infection and in our  
403 case on their fatty acid composition.

404 If we can understand how the parasite manages to modulate the host's immune response and  
405 escape its lysis inside the macrophage, and if we can understand which metabolic pathways are  
406 used by the parasite for its survival, we will be able to investigate about new treatments and  
407 preventive approaches against leishmaniasis.

408

409

#### 410 **Acknowledgements**

411

412 Enzymatic isotypings were performed by Dr. Zoubir Harrat and Dr. Fakhri from Pasteur  
413 Institute of Algeria and by Professeur Francine Pratlong from the French National Reference  
414 Center for Leishmaniasis in Montpellier (BRC-Leish, BioBank). Cell cultures and ROS  
415 measurements were performed with the assistance of Marion Guichard and Emeline Cros-  
416 Perrial.

417 **Funding:** This work was supported by National Institute for Applied Sciences and University  
418 Claude Bernard Lyon.

419

420

## References

- 421 Araujo-Santos, T., Prates, D.B., Franca-Costa, J., Luz, N.F., Andrade, B.B., Miranda, J.C.,  
422 Brodskyn, C.I., Barral, A., Bozza, P.T., Borges, V.M., 2014. Prostaglandin  
423 E2/leukotriene B4 balance induced by *Lutzomyia longipalpis* saliva favors *Leishmania*  
424 *infantum* infection. *Parasit. Vectors* 7, 601. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0601-8>
- 425 Berman, J.D., Gallalee, J.V., Best, J.M., Hill, T., 1987. Uptake, distribution, and oxidation of  
426 fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes. *J. Parasitol.* 73, 555–60.
- 427 Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J.*  
428 *Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- 429 Bott, E., Carneiro, A.B., Gimenez, G., López, M.G., Lammel, E.M., Atella, G.C., Bozza, P.T.,  
430 Belaunzarán, M.L., 2018. Lipids From *Trypanosoma cruzi* Amastigotes of RA and K98  
431 Strains Generate a Pro-inflammatory Response via TLR2/6. *Front. Cell. Infect.*  
432 *Microbiol.* 8, 151. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00151>
- 433 Bouazizi-Ben Messaoud, H., Guichard, M., Lawton, P., Delton, I., Azzouz-Maache, S., 2017.  
434 Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation  
435 of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Amastigotes. *Lipids* 52, 433–441.  
436 <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4233-6>
- 437 Carfagna, I.E., Penas, F.N., Bott, E., Lammel, E.M., Goren, N.B., Belaunzarán, M.L., Gimenez,  
438 G., 2020. Involvement of lipids from *Leishmania braziliensis* promastigotes and  
439 amastigotes in macrophage activation. *Mol. Immunol.* 125, 104–114.  
440 <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.06.023>
- 441 Carneiro, P.P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E.M., Bacellar, O., 2016a.  
442 The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania*  
443 *braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE* 11.  
444 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>
- 445 Carneiro, P.P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E.M., Bacellar, O., 2016b.  
446 The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania*  
447 *braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PloS One* 11,  
448 e0148084. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>
- 449 Chouih, E., Amri, F., Bouslimi, N., Siala, E., Selmi, K., Zallagua, N., Ben Abdallah, R.,  
450 Bouratbine, A., Aoun, K., 2009. [Cultures on NNN medium for the diagnosis of  
451 leishmaniasis]. *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 219–224.  
452 <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.03.007>

- 453 Colas, R.A., Ashton, A.W., Mukherjee, S., Dalli, J., Akide-Ndunge, O.B., Huang, H.,  
454 Desruisseaux, M.S., Guan, F., Jelicks, L.A., Matos dos Santos, F., Nagajyothi, J.,  
455 Zingman, M.A., Reyes, J., Weiss, L.M., Serhan, C.N., Tanowitz, H.B., 2018.  
456 *Trypanosoma cruzi* Produces the Specialized Proresolving Mediators Resolvin D1,  
457 Resolvin D5, and Resolvin E2. *Infect. Immun.* 86. [https://doi.org/10.1128/IAI.00688-](https://doi.org/10.1128/IAI.00688-17)  
458 17
- 459 Coppens, I., Levade, T., Courtoy, P.J., 1995. Host plasma low density lipoprotein particles as  
460 an essential source of lipids for the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Biol.*  
461 *Chem.* 270, 5736–5741.
- 462 Covarrubias, A., Byles, V., Horng, T., 2013. ROS sets the stage for macrophage differentiation.  
463 *Cell Res.* 23, 984–985. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.88>
- 464 De Cicco, N.N., Pereira, M.G., Correa, J.R., Andrade-Neto, V.V., Saraiva, F.B., Chagas-Lima,  
465 A.C., Gondim, K.C., Torres-Santos, E.C., Folly, E., Saraiva, E.M., Cunha, E.S.N.L.,  
466 Soares, M.J., Atella, G.C., 2012. LDL uptake by *Leishmania amazonensis*: involvement  
467 of membrane lipid microdomains. *Exp. Parasitol.* 130, 330–40.  
468 <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.014>
- 469 Deschacht, M., Van Assche, T., Hendrickx, S., Bult, H., Maes, L., Cos, P., 2012. Role of  
470 oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon  
471 *Leishmania* infection. *Parasitology* 139, 1429–1437.  
472 <https://doi.org/10.1017/S003118201200073X>
- 473 Gantt, K.R., Goldman, T.L., McCormick, M.L., Miller, M.A., Jeronimo, S.M., Nascimento,  
474 E.T., Britigan, B.E., Wilson, M.E., 2001. Oxidative responses of human and murine  
475 macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*  
476 167, 893–901. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.893>
- 477 Innes, J.K., Calder, P.C., 2018. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot.*  
478 *Essent. Fatty Acids* 132, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2018.03.004>
- 479 Kabututu, Z., Martin, S.K., Nozaki, T., Kawazu, S., Okada, T., Munday, C.J., Duszenko, M.,  
480 Lazarus, M., Thuita, L.W., Urade, Y., Kubata, B.K., 2003. Prostaglandin production  
481 from arachidonic acid and evidence for a 9,11-endoperoxide prostaglandin H2 reductase  
482 in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 33, 221–8.
- 483 Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.-P., Rousset, P., Chêne, G., Guigné, C.,  
484 Tercé, F., Vanner, S., Vergnolle, N., Bertrand-Michel, J., Dubourdeau, M., Cenac, N.,  
485 2013. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-  
486 inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J. Chromatogr.*

487 B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. 932, 123–133.  
488 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.06.014>

489 Lee, S.H., Stephens, J.L., Englund, P.T., 2007. A fatty-acid synthesis mechanism specialized  
490 for parasitism. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 287–297. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1617>

491 López-Muñoz, R.A., Molina-Berríos, A., Campos-Estrada, C., Abarca-Sanhueza, P., Urrutia-  
492 Llancaqueo, L., Peña-Espinoza, M., Maya, J.D., 2018. Inflammatory and Pro-resolving  
493 Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. *Front.*  
494 *Microbiol.* 9, 1961. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01961>

495 Maache, M., Azzouz, S., Diaz de la Guardia, R., Alvarez, P., Gil, R., de Pablos, L.M., Osuna,  
496 A., 2005. Host humoral immune response to Leishmania lipid-binding protein. *Parasite*  
497 *Immunol.* 27, 227–234. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2005.00773.x>

498 Machado, F.S., Mukherjee, S., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., Ashton, A.W., 2011. Bioactive  
499 lipids in *Trypanosoma cruzi* infection. *Adv. Parasitol.* 76, 1–31.  
500 <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3>

501 Marion-Letellier, R., Savoye, G., Ghosh, S., 2015. Polyunsaturated fatty acids and  
502 inflammation. *IUBMB Life* 67, 659–667. <https://doi.org/10.1002/iub.1428>

503 Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time  
504 for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>

505 Mathur, R., Das, R.P., Ranjan, A., Shaha, C., 2015. Elevated ergosterol protects *Leishmania*  
506 parasites against antimony-generated stress. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp.*  
507 *Biol.* 29, 4201–13. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272757>

508 Paloque, L., Perez-Berezo, T., Abot, A., Dalloux-Chioccioli, J., Bourgeade-Delmas, S.,  
509 Faouder, P.L., Pujo, J., Teste, M.-A., François, J.-M., Schebb, N.H., Mainka, M.,  
510 Rolland, C., Blanpied, C., Dietrich, G., Bertrand-Michel, J., Deraison, C., Valentin, A.,  
511 Cenac, N., 2019. Polyunsaturated fatty acid metabolites: biosynthesis in *Leishmania* and  
512 role in parasite/host interaction. *J. Lipid Res.* 60, 636–647.  
513 <https://doi.org/10.1194/jlr.M091736>

514 Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A.,  
515 Mortara, L., 2018. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers  
516 or Builders? *J. Immunol. Res.* 2018, 8917804. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>

517 Reybier, K., Ribaut, C., Coste, A., Launay, J., Fabre, P.L., Nepveu, F., 2010. Characterization  
518 of oxidative stress in *Leishmaniasis*-infected or LPS-stimulated macrophages using  
519 electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2566–2572.  
520 <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.021>

521 Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of  
522 Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol.*  
523 *Hum. Comp.* 65, 111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>

524 Roma, E.H., Macedo, J.P., Goes, G.R., Gonçalves, J.L., Castro, W. de, Cisalpino, D., Vieira,  
525 L.Q., 2016. Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads  
526 and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasit. Vectors* 9, 193.  
527 <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1472-y>

528 Saha, A., Biswas, A., Srivastav, S., Mukherjee, M., Das, P.K., Ukil, A., 2014. Prostaglandin E2  
529 negatively regulates the production of inflammatory cytokines/chemokines and IL-17  
530 in visceral leishmaniasis. *J. Immunol.* 193, 2330–9.  
531 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400399>

532 Su, L.-J., Zhang, J.-H., Gomez, H., Murugan, R., Hong, X., Xu, D., Jiang, F., Peng, Z.-Y., 2019.  
533 Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and  
534 Ferroptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019, 5080843.  
535 <https://doi.org/10.1155/2019/5080843>

536 Thomazelli, A.P.F.D.S., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M., da Silva, S.S.,  
537 Alvarenga, D.S., Panis, C., Cataneo, A.H.D., Bordignon, J., Silveira, G.F., Yamauchi,  
538 L.M., de Sá, J.P.S.R., Felipe, I., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., 2018.  
539 Concanavalin-A displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human  
540 peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 1–6.  
541 <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1510960>

542 Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B.T. da S., Assolini, J.P., Gonçalves, M.D., Carloto, A.C.M.,  
543 Miranda-Sapla, M.M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W.R., 2018.  
544 Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front. Immunol.* 9,  
545 2529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>

546 Uttaro, A.D., 2014. Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by  
547 trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 196, 61–70.  
548 <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.04.001>

549 Voorheis, H.P., 1980. Fatty acid uptake by bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and other  
550 species of the kinetoplastida. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 177–186.

551  
552  
553  
554

555 **Legends to Figures**

556

557 **Fig. 1.** FA derivatives in control and supplemented promastigotes.

558 Fatty acid-derived oxygenated metabolites were detected by LC-MS/MS analysis in  
559 control or supplemented promastigotes (AA or DHA 50  $\mu$ M). Data represent the sum of  
560 derivatives from LA, AA or DHA, expressed as mole percent of total FA derivatives and  
561 are means  $\pm$  SD of 3 independent experiments. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$   
562 significant differences compared to control parasites by Student's t-test.

563

564 **Fig. 2.** Parasite load in control and supplemented promastigotes. J774 macrophages were  
565 infected with control or supplemented promastigotes (AA or DHA 50  $\mu$ M) for 24h at ratio 30:1  
566 parasite/cell. (A) DAPI staining of J774 macrophages infected with MON-24 promastigotes.  
567 Arrows show intracellular parasites. The images are representative of fields observed  
568 consistently in 5 independent experiments. (B) Parasite load. Data are expressed as the ratio of  
569 parasite load in supplemented promastigotes over parasite load in control promastigotes and are  
570 the mean  $\pm$  SD of 5 independent experiments. \*,  $p < 0.05$  vs respective control.

571

572 **Fig. 3.** ROS production in J774 macrophages

573 (A) Relative ROS signal in J774 macrophages infected by MON-1 and MON-24 promastigotes  
574 at increasing parasite/cell ratios for 24 h. Data are expressed as the ratios of FMI in infected  
575 macrophages over FMI in non-infected macrophages and are the mean of duplicate values of  
576 one single experiment. (B) Relative ROS signal in J774 macrophages infected by MON-1 and  
577 MON-24 promastigotes for increasing time at ratio 30:1 parasite/cell. Data are expressed as the  
578 ratio of FMI in infected macrophages over FMI in non-infected macrophages and are the mean  
579  $\pm$  SD of 7 independent experiments in duplicate values. (C) Relative ROS signal in J774  
580 macrophages infected by control or supplemented promastigotes (AA or DHA, 50 or 100  $\mu$ M)  
581 at ratio 30:1 for 4h. Data are expressed as the ratio of FMI in macrophages infected with  
582 supplemented promastigotes over FMI in macrophages infected with control promastigotes and  
583 are the mean  $\pm$  SD of 5 independent experiments in duplicate values. (D, E) Representative  
584 flow cytometry analysis of ROS levels in J774 macrophages. 1: non-infected macrophages  
585 without ROS; 2: non-infected macrophages with ROS probe; 3: macrophages infected with AA

586 supplemented promastigotes 3: macrophages infected with AA supplemented promastigotes; 4:  
587 macrophages infected with DHA supplemented promastigotes, 5: macrophages infected with  
588 control promastigotes.

589

590

591

592

593



Figure 1

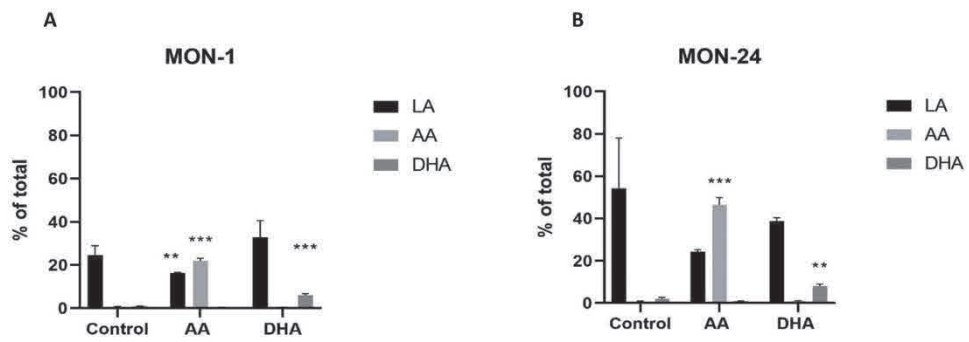


Figure 2

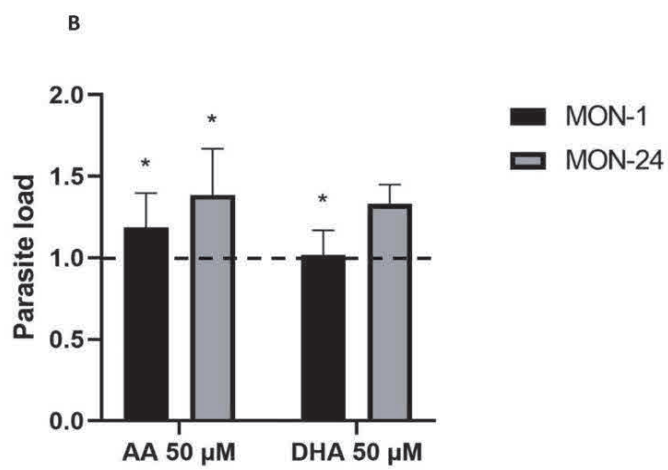
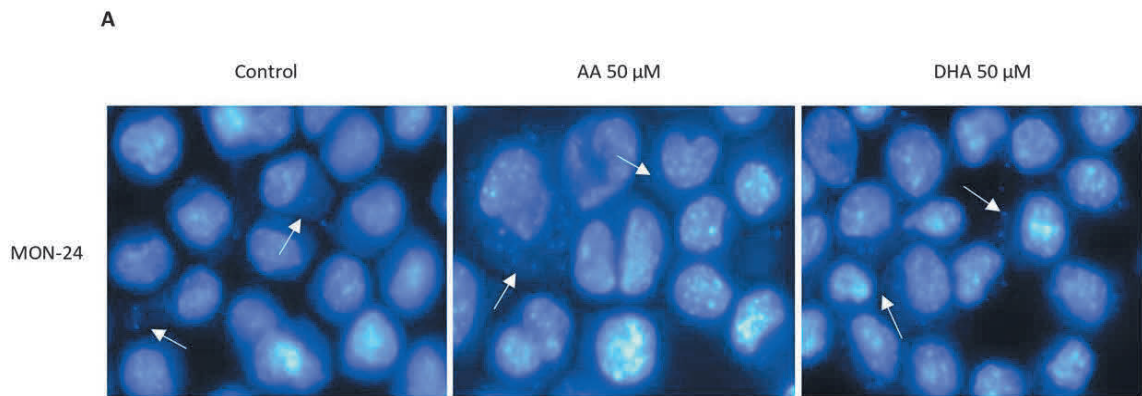
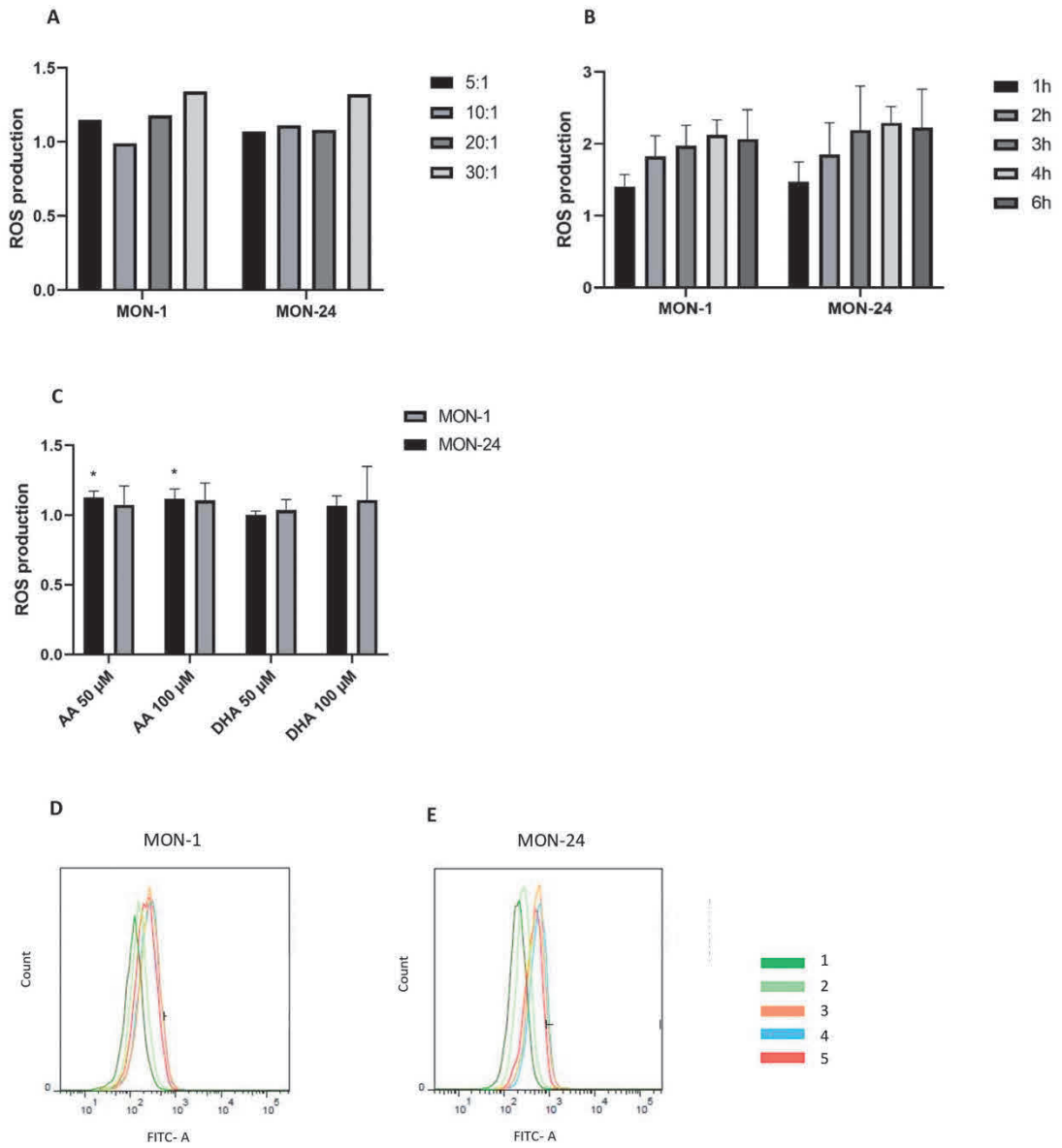


Figure 3



	Control		AA-supplemented		DHA-supplemented	
	MON-1	MON-24	MON-1	MON-24	MON-1	MON-24
<b>14:0</b>	1.01±0.2	1.58±0.2	1.15±0.32	1.2±0.2	3.06±1.14*	1.38±0.35
<b>16:0</b>	11.73±2.89	15.93±3.48	12.89±3.04	13.34±3.76	16.87±0.95*	15.02±0.35
<b>18:0</b>	18.02±2.64	11.97±0.25	12.44±2.16*	11.27±0.7	9.27±0.31***	10.8±0.13*
<b>20:0</b>	0.79±0.24	0.2±0.05	0.5±0.07	0.2±0.17	0.19±0.03**	0.16±0.01
<b>SFA</b>	31.5	29.68	26.98	26.01	29.39	27.36
<b>16:1n-9</b>	0.86±0.1	0.73±0.24	0.78±0.21	0.99±0.13	0.66±0.06*	0.81±0.02
<b>16:1n-7</b>	1.12±0.2	0.92±0.15	1.09±0.24	1.14±0.07	1.12±0.06	1.03±0.03
<b>18:1 n-9</b>	33.4±1.43	29.95±0.11	28.61±1.25**	29.3±0.86	25.57±0.43***	28±0.15**
<b>18:1n-7</b>	3.76±0.32	4.71±0.29	3.27±0.32	4.87±1.01	4.47±0.14**	4.4±0.18
<b>MUFA</b>	39.14	36.31	33.75	36.3	31.82	34.24
<b>18:2 n-6</b>	3.84±0.31	2.39±0.39	4.24±0.53	2.63±0.23	2.78±0.12***	2.58±0.03
<b>18:3n-6</b>	12.51±1.48	14.04±0.33	10.46±3.28	12.98±1.38	13.1±0.67	12.92±0.25**
<b>20:2n-6</b>	ND	0.37±0.02	0.11±0.05**	0.17±0.18	0.32±0.01***	0.32±0.04
<b>20:3n-6</b>	4.21±0.55	3.33±0.99	4.66±1.42	3.9±0.2	1.95±0.19***	3.75±0.05
<b>20:4 n-6</b>	<b>0.65±0.11</b>	<b>0.89±0.07</b>	<b>10.38±1.77***</b>	<b>5.77±1.66*</b>	<b>0.77±0.04**</b>	<b>0.92±0.03</b>
<b>22:4n-6</b>	0.61±0.11	0.7±0.02*	0.39±0.09*	0.63±0.03*	0.72±0.03	0.66±0.02*
<b>n-6 PUFA</b>	21.82	21.71	30.24	26.08	19.64	21.15
<b>18:3n-3</b>	0.47±0.09	0.01±0.02	0.22±0.08*	0.05±0.03	0.03±0***	0.02±0
<b>20:3n-3</b>	0.08±0.17	0.05±0.01	0.65±0.53	0.06±0.003	0.06±0.01	0.06±0.0008
<b>20:5n-3</b>	ND	0.03±0.004	0.13±0.05**	0.1±0.06	0.04±0***	0.03±0.007
<b>22:5n-3</b>	3.47±0.52	5.95±0.98	3.79±0.23	5.64±0.54	6.1±0.41***	6.22±0.06
<b>22:6n-3</b>	<b>3.49±0.62</b>	<b>6.22±0.78</b>	<b>4.26±0.3</b>	<b>5.77±0.41</b>	<b>12.91±1.17***</b>	<b>10.91±0.54***</b>
<b>n-3 PUFA</b>	7.51	12.26	9.05	11.57	19.14	17.22

**Table 1.** Fatty acid composition of total lipids from control and fatty acid-supplemented promastigotes. The fatty acid composition was determined by GC analysis as described in materials and methods. Data, expressed as mole percent, are means ± SD of 4 independent determinations \* p ≤ 0.05, \*\* p ≤ 0.01, \*\*\* p ≤ 0.001 significant differences compared to respective control by Student's t-test. SFA, saturated fatty acids; MUFA, monounsaturated fatty acids; PUFA, polyunsaturated fatty acids.

	Control		AA-supplemented		DHA-supplemented	
	MON-1	MON-24	MON-1	MON-24	MON-1	MON-24
<b>LA</b>						
10-TriHOME	3,63 ± 0,49	7,13 ± 5,64	3,39 ± 0,12	3,76 ± 0,77	10,72 ± 3,67*	10,23 ± 0,57
12-TriHOME	4,58 ± 0,84	10,41 ± 6,02	3,58 ± 0,24	4,71 ± 0,15	9,7 ± 2,62*	9,73 ± 0,99
9,10-DiHOME	0,69 ± 0,31	1,46 ± 1,01	0,3 ± 0,04	0,55 ± 0,12	0,33 ± 0,03	0,55 ± 0,07
12,13-DiHOME	0,45 ± 0,25	0,31 ± 0,28	0,14 ± 0,16	0,5 ± 0,14	0,74 ± 0,13	1,06 ± 0,20*
9-HODE	2,14 ± 0,42	4,26 ± 1,09	1,18 ± 0,06*	1,94 ± 0,17*	2,20 ± 0,24	3,22 ± 0,24
10-HODE	4,46 ± 2,11	8,86 ± 4,77	1,21 ± 0,08	1,75 ± 0,40	0,98 ± 0,11*	1,35 ± 0,22
13-HODE	6,19 ± 1,42	17,39 ± 4,85	5,38 ± 0,51	9,75 ± 0,39	5,05 ± 0,31	7,19 ± 0,32*
9-Oxo-ODE	0,82 ± 0,12	0,37 ± 0,64	0,4 ± 0,02**	0,37 ± 0,35	1,44 ± 0,39	2,31 ± 0,12**
13-OxoODE	1,65 ± 0,39	3,95 ± 1,9	0,63 ± 0,05**	0,94 ± 0,17	1,63 ± 0,57	3,12 ± 0,09
<b>AA</b>						
PGE2	ND	ND	0,57 ± 0,12***	1,68 ± 0,29***	ND	ND
PGD2	ND	ND	1,3 ± 0,01***	2,37 ± 0,46***	ND	ND
11B-PGF2 $\alpha$	ND	0,96 ± 1,66	0,19 ± 0,17	0,09 ± 0,15	0,7 ± 0,03***	1,22 ± 0,08
LxA4	ND	ND	0,24 ± 0,02***	0,53 ± 0,06***	ND	ND
5-HETE	0,34 ± 0,08	0,59 ± 0,22	4,73 ± 0,14***	9,66 ± 0,74***	0,24 ± 0,03	0,59 ± 0,06
8-HETE	ND	ND	4,15 ± 0,69***	8,41 ± 1,33***	ND	ND
12-HETE	ND	ND	0,36 ± 0,05***	0,55 ± 0,12*	ND	ND
15-HETE	0,29 ± 0,11	0,25 ± 0,26	1,6 ± 0,09***	3,42 ± 0,08***	0,2 ± 0,02	0,45 ± 0,03
5,6-EET	ND	ND	0,53 ± 0,12**	1,43 ± 0,06***	ND	ND
8,9-EET	ND	ND	0,67 ± 0,07***	2,46 ± 0,2***	ND	ND
11,12-EET	ND	ND	4,81 ± 0,16***	9,13 ± 0,88***	ND	ND
14,15-EET	ND	ND	2,99 ± 0,37***	6,87 ± 0,67***	ND	ND
<b>DHA</b>						
17-HDoHE	0,5 ± 0,05	1,08 ± 0,33	0,25 ± 0,07**	0,47 ± 0,03*	4,09 ± 0,55***	4,45 ± 0,7**
14-HDoHE	0,37 ± 0,09	0,99 ± 0,36	0,18 ± 0,02*	0,41 ± 0,03	1,98 ± 0,18***	3,47 ± 0,49**

**Table 2.** Relative distribution of fatty acid oxygenated metabolites in control and fatty acid-supplemented promastigotes. Fatty acid oxygenated metabolites were detected by LC-MS/MS analysis as described in materials and methods. Data are expressed as mole percent and are means  $\pm$  SD of 3 independent determinations. Table includes LA, AA and DHA derivatives; total is less than 100% as hydroxylated derivatives from saturated fatty acids are not shown. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$  significant differences compared to respective control by Student's t-test. ND: not detected.

	Total lipids		Free Fatty acids	
	μM	% total	μM	% total
<b>14:0</b>	22.4	2.1	1.5	1.7
<b>16:0</b>	330	30.6	27.0	30.0
<b>18:0</b>	173	16.0	16.5	18.0
<b>16:1n-9</b>	27.2	2.5	0.6	0.7
<b>16:1n-7</b>	30.6	2.8	0.5	0.5
<b>18:1n-9</b>	239.1	22.2	8.0	9.0
<b>18:1n-7</b>	64.8	6.0	2.4	2.7
<b>18:2n-6</b>	41.6	3.9	1.5	1.7
<b>18:3n-6</b>	2.1	0.2	2.8	3.2
<b>20:3n-6</b>	18.4	1.7	ND	ND
<b>20:4n-6</b>	<b>56.2</b>	<b>5.2</b>	<b>14.0</b>	<b>15.7</b>
<b>18:3n-3</b>	3.2	0.3	13.6	15.2
<b>20:5n-3</b>	8.6	0.8	ND	ND
<b>22:5n-3</b>	24.7	2.3	0.2	0.2
<b>22:6n-3</b>	<b>35.4</b>	<b>3.3</b>	<b>1.4</b>	<b>1.5</b>

**Supplementary Table 1.** Fatty acid composition of total (free and esterified) lipids and free fatty acids in serum. Fatty acid composition was determined by GC analysis as described in materials and methods. Data are expressed as μM or mole percent and are the means of 2 independent determinations. ND: not detected.

## *Étude 2 : Étude de l'impact du BMP dans l'infection.*

### **I. Introduction**

Le bis(monoacylglycéro)phosphate (BMP) est un phospholipide particulier que l'on trouve principalement dans l'endosome tardif, dont le rôle dans la biogenèse et la dynamique des vésicules endocytiques, les mécanismes de fusion et les fonctions de tri des endosomes tardifs est bien documenté. Le mécanisme d'entrée des promastigotes de *Leishmania* par les macrophages de l'hôte implique la phagocytose, une endocytose particulière. La survie intracellulaire du parasite nécessite alors des mécanismes de fusion de la vacuole parasitophore avec le compartiment endosome tardif/lysosome selon des mécanismes encore mal caractérisés. Une hypothèse est que par sa présence dans les endosomes tardifs et ses propriétés fusogènes, la BMP de la cellule hôte pourrait réguler l'internalisation du parasite et/ou la biogenèse de la vacuole parasitophore. Les travaux antérieurs de l'équipe ont également démontré que le BMP régule le transport intracellulaire du cholestérol et la production d'oxystérols dans les macrophages, en coopération avec la protéine de transport ORP11. Une deuxième hypothèse est que le BMP, à travers la régulation des transferts de stérols, pourrait jouer un rôle dans l'infection à *Leishmania*.

Bien que le BMP soit un phospholipide mineur, il semble être omniprésent dans les cellules eucaryotes. Notre hypothèse est que le BMP est fonctionnellement actif chez *Leishmania*. En effet, le promastigote présente une poche flagellaire qui fait partie de la machinerie endosomale essentielle aux interactions entre le parasite et son environnement. De plus, les promastigotes utilisent un mécanisme de sécrétion basé sur les exosomes pour libérer des facteurs de virulence et immunosuppresseurs dans l'environnement des cellules hôtes. Il convient de noter que l'équipe a récemment montré que le BMP participe à la formation/sécrétion de vésicules extracellulaires caractérisées comme des exosomes par des cellules de mammifères et notamment par les macrophages (Rabia et al., 2020).

Nos objectifs sont de caractériser les BMP chez *Leishmania* et les macrophages infectés, et d'étudier les fonctions du BMP au cours de l'infection parasitaire.

## II. Résultats

Les résultats présentés dans ce chapitre ont plus spécifiquement visé à étudier les aspects suivants :

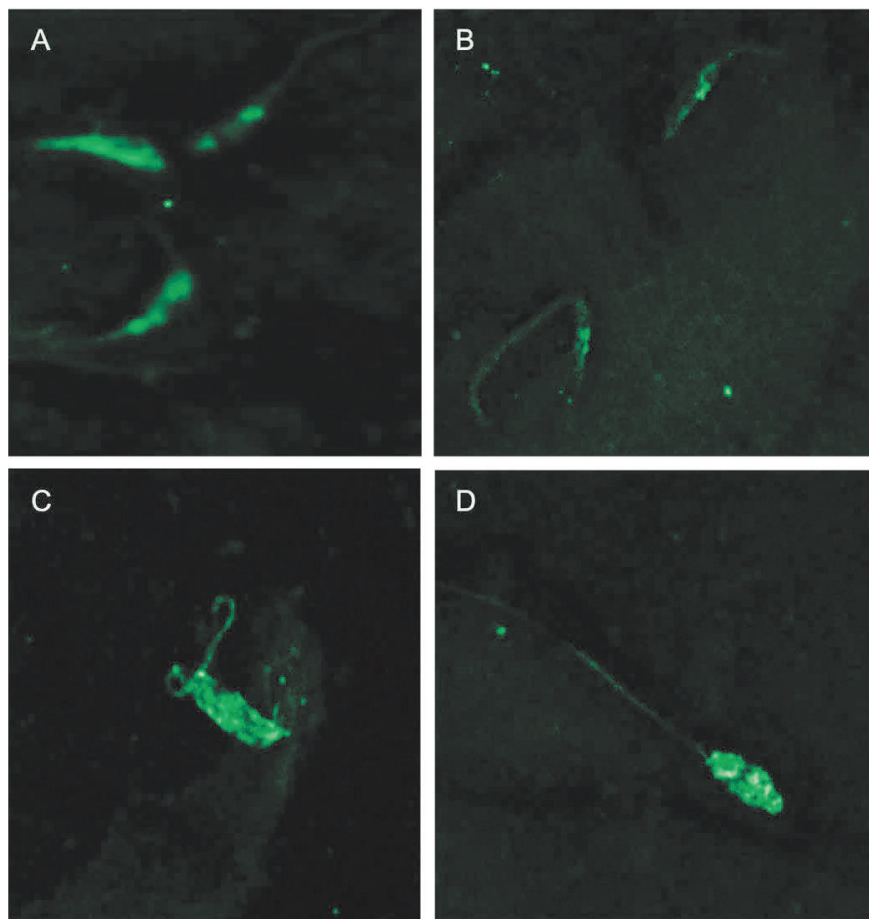
1. Déterminer la présence et la localisation du BMP dans les formes promastigotes et amastigotes
2. Déterminer les conséquences d'un enrichissement en BMP dans les macrophages sur l'infectivité de *Leishmania*

### 1. Caractérisation du BMP dans les promastigotes et dans les macrophages infectés

#### a. Mise en évidence du BMP des promastigotes par immunofluorescence

Afin de mettre en évidence le BMP chez les promastigotes de *Leishmania*, un marquage avec un anticorps anti-BMP et un anticorps secondaire couplé à Alexa fluor 488 a été réalisé. Comme le montre la figure 46, la fluorescence est observée chez les promastigotes *Leishmania* au niveau cytosolique ainsi qu'au niveau du flagelle. A noter qu'aucune fluorescence n'est observée en l'absence de l'anticorps primaire, confirmant la spécificité du marquage BMP. La résolution étant moyenne en raison de la taille des promastigotes, il n'est pas possible de préciser la localisation intracellulaire du BMP. Ce résultat permet toutefois de conclure que le BMP est présent chez les promastigotes.

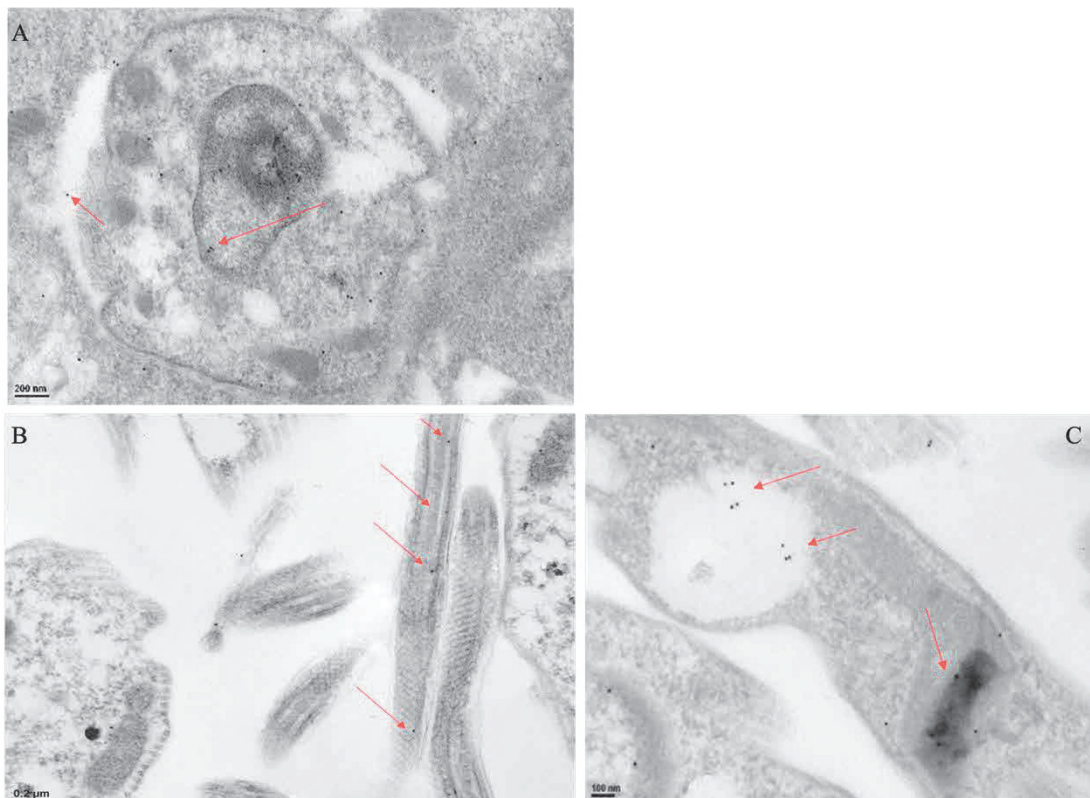




**Figure 46. Observation du BMP dans les promastigotes.** Observation d'image de microscopie à fluorescence du BMP chez MON-24 (A), observation d'image de microscopie confocale du BMP chez MON-1 (B, C, D). Le BMP a été marqué avec un anticorps anti-BMP et un anticorps secondaire conjugué à Alexa Fluor 488.

**b. Mise en évidence du BMP dans les promastigotes et amastigotes intramacrophagiques par microscopie électronique à transmission**

Un marquage par immunogold et observation en microscopie électronique a été réalisé pour confirmer la présence du BMP dans les deux formes du parasite *Leishmania*. Le marquage immunogold et l'analyse par microscopie électronique ont été réalisés au centre d'imagerie quantitative de Lyon-Est (CIQLE). Les figures 47A et 47B, mettent en évidence la présence de BMP à différentes localisations. Chez la forme amastigote, le BMP est localisé notamment au niveau de la vacuole parasitophore et au niveau de son cytoplasme (Figure 47A). Chez le promastigote, le BMP est localisé dans une vacuole, au niveau de son kinétoplaste et de son flagelle (Figure 47B, C).

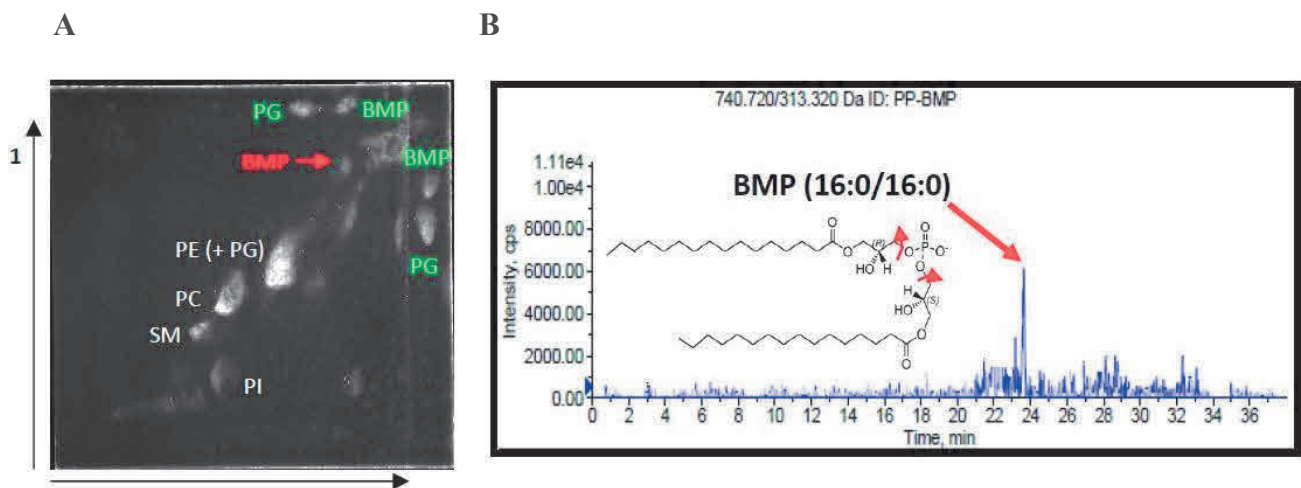


**Figure 47. Observation au microscope électronique à transmission de BMP chez *Leishmania*.** Observation de la forme amastigote intramacrophagique de la souche MON-1, (A) Observation de la forme promastigote de la souche MON-24(B, C). Le BMP a été marqué avec un anticorps primaire anti-BMP et un anticorps secondaire conjugué à l'or.

### c. Caractérisation biochimique du BMP dans les promastigotes de *Leishmania*

Nous avons aussi recherché la présence de BMP dans les promastigotes par une identification biochimique.

La figure 48A montre la présence de BMP dans l'extrait lipidique des promastigotes MON-1. L'analyse par 2D-HPTLC révèle, dans l'extrait biologique, un spot co-migrant avec le standard du BMP. Le BMP a été analysé par LC-MS/MS (Figure 48B), montrant la présence de l'espèce moléculaire 16:0/16:0 BMP. Bien que préliminaires, les analyses indiquent que cette espèce est majoritaire chez *Leishmania*. Ceci diffère des mammifères, chez lesquels les espèces moléculaires majoritaires du BMP sont le plus souvent des espèces à 18:1.



**Figure 48. Caractérisation biochimique des BMP dans les promastigotes de la souche MON-1.** (A), l'extrait lipidique total a été analysé par 2D-HPTLC : le spot BMP (rouge) migre comme le standard BMP (vert). (B), le BMP a été identifié par LC-MS/MS (ESI mode positif).

### 2. Conséquences d'un enrichissement en BMP sur l'infection des macrophages

Afin de stimuler la synthèse de BMP dans les macrophages J774, nous avons utilisé le modèle de supplémentation en PG qui est le précurseur du BMP. Dans les travaux réalisés précédemment dans les macrophages RAW 264.7, il a été démontré que la supplémentation en dioleil-phosphatidylglycérol di18:1-PG (DOPG) induit un enrichissement spécifique en BMP, tandis que le dipalmitoyl-PG di16:0-PG (DPPG) n'est pas converti en BMP (Luquain-Costaz et al., 2013).

Des macrophages J774 ont donc été supplémentés avec soit du DOPG (18:1/18:1-PG) pour induire un enrichissement en BMP, soit du DPPG (16:0/16:0-PG) pour servir de contrôle négatif. L'effet de la supplémentation a été évalué d'une part sur la quantité de BMP dans les macrophages et d'autre part sur l'infection par des promastigotes des souches MON-1 et MON-24.

#### **a. Effet de la supplémentation en DOPG ou DPPG sur l'infection**

Les conséquences de la supplémentation des macrophages en PG ont été évaluées sur différents temps d'infection pour déterminer l'impact sur l'association (2h), la multiplication (24h) et la survie (24h d'infection + 24h en culture) du parasite. L'infectivité a été évaluée par le taux d'infection et la charge parasitaire tels que définis dans matériels et méthodes.

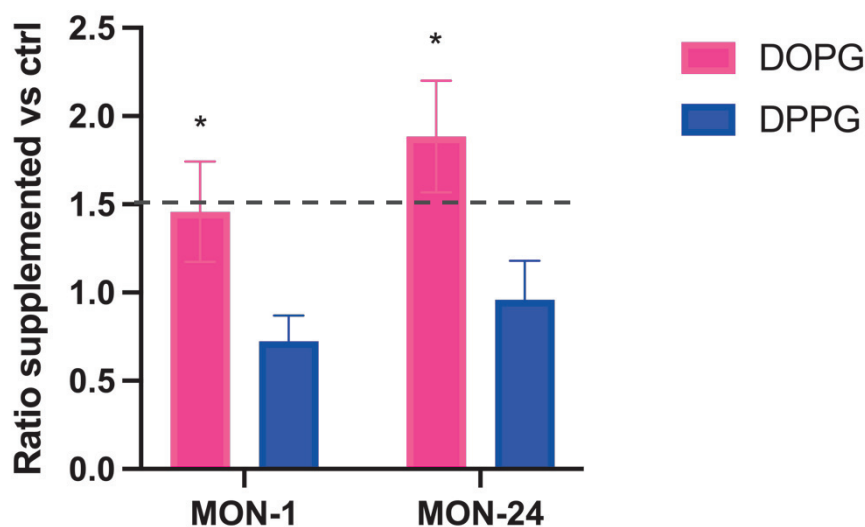
- **Après 2h d'infection (association)**

Après 2h d'infection, l'association peut être définie, c'est-à-dire le contact des parasites avec les macrophages. L'ajout de DOPG ou de DPPG dans le milieu de culture est réalisé pendant toute la durée de la manipulation.

Pour les deux souches, le taux d'infection est d'environ 20 à 30 % des macrophages. Lorsque les macrophages sont supplémentés en DOPG, une augmentation significative du pourcentage de macrophages infectés est observée pour la souche MON-24 (Tableau 3). Aucun changement significatif n'est observé avec la supplémentation en DPPG quelle que soit la souche. Comme le montre la figure 49, la charge parasitaire dans les macrophages supplémentés en DOPG a augmenté significativement de 40% et 80% pour MON-1 et MON-24 respectivement, par rapport aux macrophages témoins. En revanche, la charge parasitaire n'a pas augmenté après infection des macrophages supplémentés en DPPG par des promastigotes MON-1 ou MON-24, indiquant une spécificité de la supplémentation en DOPG.

**Tableau 3. Pourcentage de macrophages infectés après supplémentation des macrophages en DOPG ou DPPG et infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24.** Les données sont exprimées en pourcentage et le  $\pm$  SD moyen de 5 expériences indépendantes (DOPG) et de 3 manipulations indépendantes (DPPG). \*,  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  par rapport au témoin respectif.

	MON-1 (%)	MON-24 (%)
Témoins	28,69 $\pm$ 10,32	21,6 $\pm$ 2,48
DOPG	38,12 $\pm$ 10,36	29,89 $\pm$ 2,76**
DPPG	16,28 $\pm$ 4,84	20,35 $\pm$ 2,94



**Figure 49. Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés.**

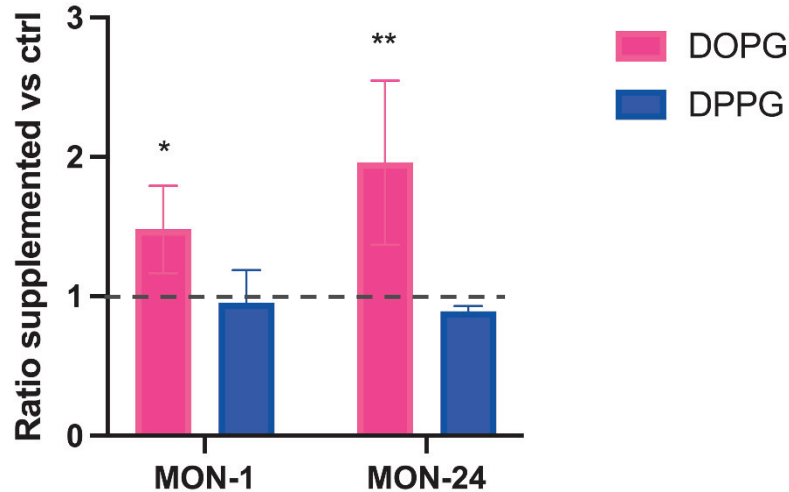
Les macrophages J774 ont été supplémentés avec du DOPG ou du DPPG pendant 24h puis infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 2h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages supplémentés en DOPG ou DPPG sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins et sont le  $\pm$  SD moyen de 5 expériences indépendantes (DOPG) et de 3 expériences indépendantes (DPPG). \*,  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  par rapport au témoin respectif.

- **Après 24h d'infection**

Les taux d'infection après 24h d'incubation sont d'environ 28 % dans les macrophages J774 témoins pour les deux souches. Après supplémentation en DOPG, une augmentation significative du pourcentage de macrophages infectés est observée pour la souche MON-1 et MON-24 respectivement. (Tableau 4). Comme le montre la figure 50, la charge parasitaire dans les macrophages supplémentés en DOPG a augmenté significativement de 48% et 96% pour MON-1 et MON-24 par rapport aux macrophages témoins. La supplémentation en DPPG est sans effet à la fois sur le taux d'infection et la charge parasitaire pour les deux souches étudiées (tableau 4 et figure 50) confirmant la spécificité de la supplémentation en DOPG.

**Tableau 4. Pourcentage de macrophages infectés après supplémentation en DOPG ou DPPG et infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24.** Les données sont exprimées en pourcentage et le  $\pm$  SD moyen de 4 expériences indépendantes (DOPG) et de 3 manipulations indépendantes (DPPG). \*,  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  par rapport au témoin respectif.

	<b>MON-1 (%)</b>	<b>MON-24 (%)</b>
<b>Témoins</b>	28,21 $\pm$ 8,78	28,0 $\pm$ 12,2
<b>DOPG</b>	36,33 $\pm$ 4,08*	44,95 $\pm$ 6,32*
<b>DPPG</b>	29,12 $\pm$ 5,02	24,58 $\pm$ 5,41

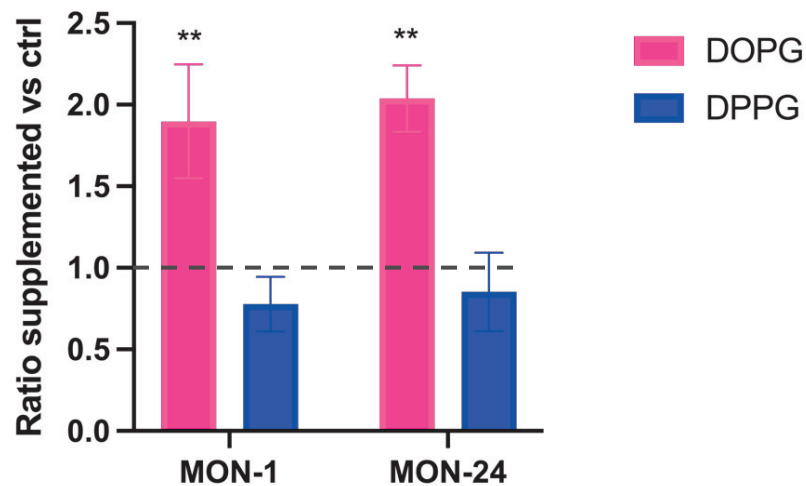


**Figure 50. Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés.** Les macrophages J774 ont été supplémentés avec du DOPG ou du DPPG pendant 24h puis infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 24h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages supplémentés en DOPG ou DPPG sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins et sont le  $\pm$  SD moyen de 4 expériences indépendantes (DOPG) et de 3 expériences indépendantes (DPPG). \*,  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  par rapport au témoin respectif.

- **Après 24h d'infection et 24h supplémentaire en culture (survie)**

Après 24h d'infection en présence des parasites, les cellules sont lavées trois fois au PBS et du milieu RPMI complet est ajouté. Les cellules sont ainsi maintenues en culture pendant 24h supplémentaires afin d'évaluer la survie des parasites intracellulaires. C'est-à-dire la capacité des amastigotes intracellulaires à survivre dans les macrophages. La supplémentation en DOPG ou DPPG dans le milieu de culture est maintenue pendant toute la durée de l'expérience.

Comme le montre la figure 51, la charge parasitaire a doublé pour MON-1 et MON-24 lors de l'infection des macrophages supplémentés en DOPG. La survie du parasite est donc significativement améliorée dans les macrophages supplémentés en DOPG par rapport aux macrophages témoins. Dans le cas des macrophages supplémentés en DPPG, aucune modification de la charge parasitaire n'est observée confirmant la spécificité de la supplémentation en DOPG pour la survie des amastigotes de *Leishmania*.



**Figure 51. Charge parasitaire chez les macrophages témoins et supplémentés.**

Les macrophages J774 ont été supplémentés avec du DOPG ou du DPPG pendant 24h puis infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 à un ratio de 10:1 parasites/cellule pendant 24h, lavés et remis en culture 24h supplémentaire. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages supplémentés en DOPG ou DPPG sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins et sont le  $\pm$  SD moyen de 4 expériences indépendantes (DOPG) et de 3 expériences indépendantes (DPPG). \*,  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$  par rapport au témoin respectif.

#### **b. Effet de la supplémentation en DOPG sur la quantité de BMP dans les macrophages J774**

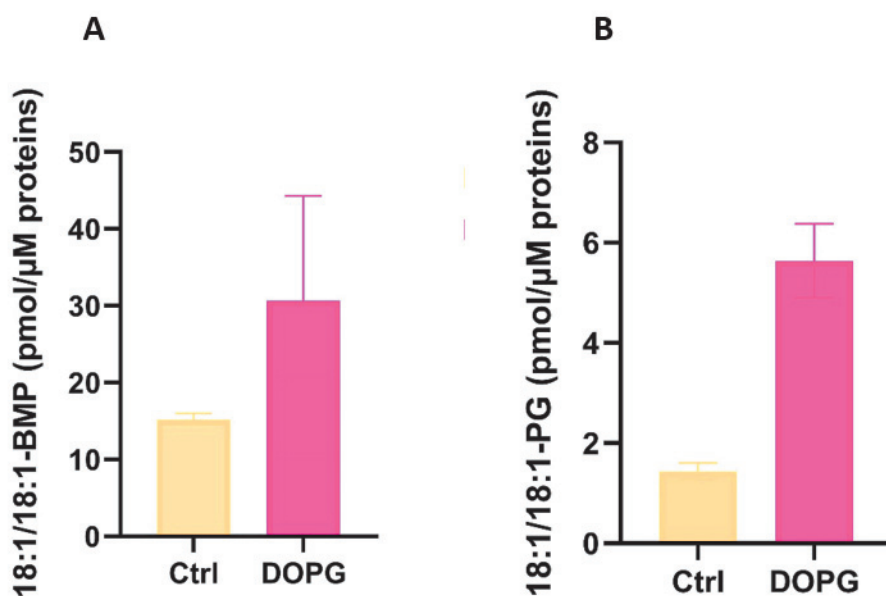
Afin de valider le modèle de supplémentation, nous avons en parallèle déterminé les quantités de BMP dans les macrophages contrôles et supplémentés. Les macrophages J774 ont été incubés en l'absence ou en présence de DOPG à 30  $\mu$ M pendant 24h.

L'analyse du BMP par LC-MS/MS s'est portée sur deux espèces spécifiques : le 18:1/18:1-BMP (OO-BMP) et le 18:1/18:1-PG (OO-PG). Celle-ci indique que la supplémentation en DOPG induit une augmentation d'environ 2 fois du 18:1-18:1-BMP (OO-BMP) par rapport aux macrophages contrôles (Figure 52A).

Ce résultat est en accord avec les données rapportées pour les macrophages RAW 264.7 supplémentés en DOPG dans les mêmes conditions (Luquain-Costaz et al., 2013).



Les analyses révèlent aussi une augmentation d'environ 4 fois de la quantité de 18:1/18:1-PG (OO-PG) dans les macrophages J774 supplémentés ((Figure 52B), alors que ce dernier ne s'accumule pas dans les RAW (Luquain-Costaz et al., 2013). La quantité totale de OO-PG est toutefois plus faible que celle du OO-BMP (environ 5 fois) et l'accumulation absolue est aussi plus faible (+5 pmoles/uM de protéines pour le PG vs +15 pour le BMP), ce qui suggère que les effets observés sur l'infection pourraient résulter de l'augmentation de BMP plutôt que du PG.



**Figure 52. Quantification du OO-BMP (dioleoyl-BMP) et du OO-PG.**

Le BMP des macrophages J774 témoins et supplémentés en DOPG pendant 24h a été quantifié par LC-MS/MS comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont la moyenne  $\pm$  SD d'une manipulation en triplicat.

### III. Discussion

Compte tenu du rôle du BMP dans le trafic endosomal, y compris la fusion des membranes endosomales tardives et le transport du cholestérol, nous avons souhaité déterminer son rôle dans l'infection à *L. infantum*.

A ce jour, seule une étude a montré la présence de BMP dans la vacuole parasitophore de *Leishmania amazonensis*, et suggéré l'existence d'un point de confluence entre les voies endocytique et autophagosomale (Schaible et al., 1999). Nos données révèlent donc pour la première fois la présence du BMP dans les deux formes du parasite. Chez le promastigote, le BMP est au niveau du kinétoplaste et du flagelle tandis que chez l'amastigote, il est au niveau de la vacuole parasitophore et du cytoplasme. L'espèce moléculaire majoritaire du BMP identifiée chez *Leishmania* est le di16:0-BMP, ce qui diffère de chez les mammifères, où l'espèce majoritaire retrouvée est le plus souvent le di 18:1-BMP (Besson et al., 2006; Bouvier et al., 2009; Luquain et al., 2000).

Dans notre étude nous avons voulu évaluer le rôle du BMP des macrophages dans l'infection par *Leishmania*. Un modèle de supplémentation avec le précurseur DOPG a pour cela été utilisé afin d'induire une augmentation du BMP intracellulaire dans les macrophages, comme précédemment montré dans les macrophages RAW 264.7 (Luquain-Costaz et al., 2013). Différents temps et étapes d'infection par *Leishmania* ont été testés, l'association, l'infection et la survie. Nos résultats suggèrent qu'après supplémentation des macrophages en DOPG, une augmentation significative des taux d'infection est observée après 2h (association) et 24h d'infection dans la souche MON-24 et seulement après 24h dans la souche MON-1. La charge parasitaire est augmentée de l'ordre de 50% dans la souche MON-1 et de l'ordre de 90% dans la souche MON-24 après 2h et 24h d'infection et est doublée dans les 2 souches à l'étape de survie.

Nos résultats indiquent donc un effet facilitateur de la supplémentation en DOPG sur l'infection par les deux souches MON-1 et MON-24. Le suivi de l'infection à différents temps montre un doublement de la charge parasitaire au niveau de la survie pour les 2 souches étudiées, alors que les effets sont différents selon la souche au niveau des étapes précédentes. Cela suggère que la supplémentation en DOPG régule davantage la survie du parasite.

Afin de vérifier la spécificité du PG utilisé nous avons supplémenté les macrophages avec un autre PG le 16:0/16:0-PG (DPPG) qui n'est pas un précurseur de BMP pour les macrophages RAW. Nos résultats ne révèlent pas d'effet de la supplémentation en DPPG sur le taux d'infection et la charge parasitaire pour les deux souches étudiées confirmant la spécificité de la supplémentation en DOPG.

Parallèlement, nous avons vérifié que le modèle de supplémentation en DOPG, préalablement mis au point dans les macrophages RAW, était validé pour les macrophages J774 (Bouvier et al., 2009; Luquain-Costaz et al., 2013). Nos résultats indiquent une augmentation d'environ 2 fois de la quantité de 18:1/18:1-BMP après l'enrichissement des macrophages J774 en DOPG pendant 24h, ce qui est en accord avec nos précédentes observations sur les macrophages RAW 264.7 (Luquain-Costaz et al., 2013). Ce modèle de supplémentation par le PG s'appuie sur différentes études métaboliques démontrant que le PG exogène est converti en BMP (Waite et al., 1987). Selon l'équipe de Waite et al., la première étape de biosynthèse du BMP impliquerait une PLA2 clivant le groupe 2-acycle du PG (Amidon et al., 1996, 1995). Après avoir purifié et caractérisé une nouvelle PLA2 lysosomale à partir de macrophages RAW264., ils ont révélé une affinité élevée de la position sn-2 envers l'oléate (Shinozaki and Waite, 1999). Cela pourrait expliquer la synthèse efficace du BMP à partir du 18:1/18:1-PG. Cependant, à ce stade encore préliminaire de nos travaux, seule l'espèce 18:1/18:1-BMP a été quantifiée. Il est donc nécessaire d'identifier et de quantifier toutes les espèces moléculaires du BMP afin d'affiner le taux de BMP et son augmentation après supplémentation dans les macrophages J774.

Contrairement au RAW 264.7, un enrichissement en 18:1/18:1-PG est aussi observé dans les macrophages J774 supplémentés en DOPG. L'accumulation en PG est faible en proportion de l'augmentation du BMP, mais non négligeable. Une étude a démontré la capacité du PG à inhiber l'action du TLR2 et TLR4 par des modèles moléculaires associés aux agents pathogènes. En effet, le PG inhibe l'expression de plusieurs cytokines dans les macrophages RAW 264.7 ainsi que la sécrétion de TNF- $\alpha$ . (Choudhary et al., 2019; Klein et al., 2020). Cela pourrait expliquer l'augmentation de la charge parasitaire dans les macrophages enrichis en 18:1/18:1-PG.

A ce stade de nos observations, se pose donc la question du mécanisme responsable des effets observés sur l'infection, augmentation du BMP et/ou du PG ? L'absence d'effet du DPPG dont on suppose qu'il n'est pas converti en BMP renforce néanmoins l'idée que les effets de la supplémentation en DOPG sur l'infection sont dus au BMP (Luquain-Costaz et al., 2013). La quantification du BMP et du PG dans des macrophages supplémentés en DPPG est donc nécessaire pour appuyer cette conclusion. Afin de consolider nos résultats, des études complémentaires avec l'anticorps anti-BMP peuvent être envisagées. En effet, l'anticorps anti-BMP interagit spécifiquement avec le BMP présent dans les macrophages et pas avec le PG. Une expérience intéressante serait donc d'évaluer les conséquences de l'anticorps anti-BMP sur les charges parasitaires, en particulier au niveau de la survie du parasite.

L'ensemble de nos observations semble donc être en faveur d'un rôle du BMP dans l'infection, qui devra être confirmé par des expériences complémentaires. Outre la question de la spécificité du BMP comparativement au PG, le mode d'action du BMP reste à élucider. Nous pouvons avancer plusieurs pistes d'investigation :

Les travaux de l'équipe ont clairement démontré que le BMP régule le transport et le métabolisme du cholestérol dans les macrophages (Arnal-Levron et al., 2019; Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Luquain-Costaz et al., 2013). Or, plusieurs travaux ont mis en évidence la nécessité du cholestérol de l'hôte dans l'infection à *Leishmania*. La phagocytose dépend de taux normaux de cholestérol dans la membrane plasmique (Pucadyil et al., 2004; Pucadyil and Chattopadhyay, 2006). Une récente étude a mis en évidence une rétention accrue du cholestérol issu de l'endocytose des LDL dans la vacuole parasitophore de *Leishmania* après infection. Ceci est en corrélation avec une concentration de cholestérol cellulaire libre séquestré autour du parasite, détectable sous forme de halo. De plus, le cholestérol lié à la membrane de la cellule hôte, bien qu'il ne contribue pas au halo de cholestérol, s'incorpore rapidement aux parasites (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017; Semini et al., 2017). Une hypothèse est que le BMP des macrophages serait nécessaire au transfert du cholestérol de l'hôte vers le parasite, notamment au niveau de la vacuole parasitophore, favorisant ainsi la multiplication et la survie du parasite. Il serait donc intéressant de quantifier le cholestérol présent dans les amastigotes après infection de macrophages supplémentés en DOPG et donc enrichis-en BMP afin de confirmer le transfert du cholestérol vers le parasite via le BMP.

Une autre hypothèse est que le BMP pourrait favoriser la formation de la vacuole parasitophore. Des études d'imageries peuvent ainsi être envisagées afin de déterminer si le BMP est localisé au niveau de la vacuole parasitophore. Des marquages avec l'anticorps anti-BMP associé à l'anti-Lamp1 et EEA1 pourraient mettre en évidence sa localisation.

En effet, la vacuole parasitophore est constituée de vésicules de la voie endocytique et certains marqueurs ont été identifiés notamment les marqueurs des endosomes précoces : EEA1 et tardifs tels que Lamp1 et Lamp2 (Liévin-Le Moal and Loiseau, 2016; Rodríguez et al., 2006).

Les macrophages jouent un rôle majeur dans la réponse à l'infection. En effet, selon la polarisation des macrophages M1 ou M2, la réponse du macrophage diffère. Les deux sous population expriment des récepteurs de surface différents (Holzmuller et al., 2018). Un macrophage M1 aura tendance à inhiber la prolifération des parasites notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires ainsi que des radicaux libres oxygénés dont l'oxyde nitrique (NO), tandis qu'un macrophage M2 produira des cytokines anti-inflammatoires et favorise la survie des parasites. Déterminer le profil des macrophages supplémentés ou non après infection par les promastigotes par dosage des cytokines est essentiel afin de comprendre davantage comment le BMP agit dans l'infection.

L'un des principaux mécanismes de contrôle de *Leishmania* est la production d'oxyde nitrique (NO) à partir de l'acide aminé L-arginine qui est converti par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS). La production de NO à des taux élevés contribue ainsi aux défenses de l'hôte. La L-arginine est aussi substrat de l'enzyme arginase 1 pour la production de L-ornithine (Rath et al., 2014). L'infection par *L. major* chez la souris a établi le paradigme de la réponse Th1 et Th2 : une réponse Th1 est associée à la production IFN- $\gamma$  et à l'expression d'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), tandis qu'une réponse Th2 est associée à la production de l'IL-4 et à l'expression de l'arginase 1. La L-ornithine est le précurseur de la L-glutamine, la L-proline et des polyamines qui sont essentielles à la survie du parasite *Leishmania* (Holzmuller et al., 2018). Le dosage de l'arginine ainsi que de du NO dans les macrophages infectés après ou non supplémentation en DOPG permettrait de déterminer la réponse du macrophage et le rôle du BMP dans l'infection.

Une étude a démontré que le récepteur toll like 4 (TLR4) est modulé par le taux de cholestérol dans les membranes cellulaires et affecté aussi par le BMP (Ciesielska et al., 2017). Le TLR4 est un récepteur important dans les infections à *L. major* et *L. braziliensis*. Les TLR sont notamment impliqués dans l'activation en aval de iNOS et COX-2 qui en fait des acteurs clés dans l'activation des macrophages d'autant plus que le TLR4 peut être impliqué dans l'induction de l'arginase 1 (Ciesielska et al., 2017). Des manipulations en utilisant des cellules mutées sur le TLR4 peuvent être alors envisagées.

*Partie IV*

*Discussion générale, conclusion et*

*perspectives*

L'ensemble de mes travaux renforce l'idée que les lipides de l'hôte comme du parasite sont importants au cours de l'infection à *Leishmania* notamment dans sa différenciation. Le parasite a développé des mécanismes sophistiqués pour manipuler et exploiter le métabolisme lipidique des cellules hôtes. Plusieurs études ont ainsi mis en avant le rôle essentiel des lipides tels que les sphingolipides, les phospholipides et les stérols dans les fonctions membranaires des parasites et dans leur virulence. En effet, les sphingolipides et les phospholipides sont essentiels à la survie et à la différenciation des promastigotes. Le cholestérol, quant à lui, est nécessaire pour l'entrée des parasites et est retrouvé dans la vacuole parasitophore.

Les travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence une modification des profils lipidiques du parasite *Leishmania* au cours de la différenciation promastigote-amastigote avec notamment un enrichissement en cholestérol en remplacement de l'ergostérol (Bouazizi-Ben Messaoud et al., 2017). De plus, l'analyse de la composition en acides gras des principales classes lipidiques a révélé un enrichissement en acides gras polyinsaturés en particulier l'acide arachidonique et l'acide docosahexaénoïque.

L'objectif principal de notre première étude était de tester l'hypothèse selon laquelle les acides gras AA et DHA dans la forme promastigote pourraient faciliter le processus de différenciation et/ou l'infection et le développement intracellulaire du parasite, en lien avec les travaux de Bouazizi Ben Messaoud et al., qui démontrent des changements dans la composition en acides gras des lipides au cours de la différenciation de la forme promastigote en amastigote. Pour cela nous avons mis au point un protocole de supplémentation des promastigotes *L. infantum* des souches MON-1 et MON-24 avec soit l'acide arachidonique soit l'acide docosahexaénoïque et nous avons regardé différents paramètres à savoir, l'enrichissement des promastigotes en acides gras, la production de métabolites oxygénés et le pouvoir infectant des parasites enrichis.

L'objectif de notre deuxième étude était de rechercher si le BMP de la cellule hôte pourrait contrôler l'infection du parasite, notamment au niveau de l'internalisation et de la survie du parasite dans le macrophage. Nous nous sommes appuyés sur les travaux portant sur l'enrichissement en BMP des macrophages RAW 264.7 selon le modèle de supplémentation avec le précurseur DOPG (Luquain-Costaz et al., 2013) et avons évalué l'impact de cet enrichissement en BMP sur différentes étapes d'infection du parasite.



Pour ces deux études, nous avons choisi d'utiliser l'espèce *Leishmania infantum* en particulier la souche MON-1, viscérotrope et la souche MON-24, dermatrope. La particularité de l'espèce *L. infantum* est qu'elle se caractérise par un large polymorphisme enzymatique. La méthode de référence pour le typage de *Leishmania* est l'électrophorèse enzymatique multilocus (MLEE). Le plus couramment utilisé est le système de Montpellier (MON) qui repose sur l'analyse de 15 enzymes. A ce jour, cette espèce comprend 30 zymodèmes chez l'homme. Certains d'entre eux sont liés à la leishmaniose viscérale (MON-27, 28, 72, 77, 187), d'autres uniquement à la leishmaniose cutanée (MON 11, 29, 33, 78, 111) et certains zymodèmes peuvent causer des cas à la fois de leishmaniose viscérale et de leishmaniose cutanée tels que MON1 et MON-24 (Aoun et al., 2000; Kallel et al., 2008, 2005; Kuhls et al., 2008). Cela a été démontré dans différents foyers tels que le sud de la France (Pratlong et al., 2004), l'Algérie (Marty et al., 1998), la Grèce (Frank et al., 1993), l'Italie (Gramiccia et al., 1992), l'Espagne (Pratlong et al., 2004) et la Tunisie (Aoun et al., 2001; Kallel et al., 2008). MON-1 est le zymodème le plus fréquent chez l'homme dans le bassin méditerranéen. Il est présent dans 30 pays et représente 70 % de toutes les souches identifiées (Ceccarelli et al., 2018). Dans le sud de la France, MON-1 représente 88% des zymodèmes identifiés.

Les résultats de l'étude 1 révèlent que l'enrichissement des deux souches en acides gras AA ou DHA est spécifique. Cet enrichissement soutient le concept selon lequel les trypanosomatidés, y compris certaines espèces de *Leishmania*, sont capables de récupérer les lipides de leur environnement hôte. Les lipoprotéines plasmatiques telles que les lipoprotéines de faible densité ont été décrites comme une source importante d'AG fournies sous forme d'esters de cholestérol et de phospholipides par le biais de processus d'internalisation (Coppens et al., 1995; De Cicco et al., 2012). De plus, les AG libres exogènes sont efficacement récupérés par les trypanosomatidés (Berman et al., 1987; Voorheis et al., 1980). En effet, des orthologues de la protéine de transport des acides gras humains (FATP) ont été identifiés dans le génome de *L. major* et plusieurs études ont suggéré la présence de protéines de liaison aux acides gras (FABP) et de FATP qui seraient impliquées dans la captation spécifique des FA chez les parasites *Leishmania* (Aquina et al., 2021; Maache et al., 2005; Uttara et al., 2014). Les changements observés dans la composition en acides gras des lipides totaux, sont plus prononcés dans la souche MON-1 que dans la souche MON-24. Nous avons également mis en évidence, dans ces conditions, une augmentation de la production de plusieurs dérivés oxygénés de ces acides gras.

Une augmentation significative des métabolites oxygénés dérivés de l'AA a été observée pour les dérivés époxy et hydroxyle tels que le 11, 12-EET, 5-HETE, 8-HETE, 14, 15- EET, 15-HETE, la PGE2 et la PGD2 et les dérivés du DHA tels que de 17-HDoHE et de 14-HDoHE dans les deux souches de *L. infantum*. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Paloque et al., qui démontrent une production de 8-HETE, 14 et 17-HDoHe chez les promastigotes métacycliques (Paloque et al., 2019). Ces dérivés HDoHE sont les précurseurs des médiateurs anti-inflammatoires (specialized pro-resolving mediators, SPM) tels que les marésines et les résolvines. Paloque et al., ont rapporté que l'exposition des macrophages aux extraits lipidiques de promastigotes infectieux contenant à la fois des dérivés AA et DHA induisait la production de SPM dans les macrophages et leur polarisation en phénotype M2. Nous avons observé que le 8-HETE et les 14 et 17-HdoHE étaient les principaux métabolites détectés dans les promastigotes supplémentés en AA ou en DHA, avec le 5-HETE et l'EET. De plus, la production plus élevée de ces métabolites dans MON-24 concorde avec l'augmentation plus élevée de l'infectivité par rapport à MON-1. Nous proposons donc que l'enrichissement des lipides promastigotes avec AA ou DHA pourrait moduler l'infectiosité du parasite par la production de métabolites oxygénés bioactifs, en particulier HETE et HdoHE. En outre, d'autres mécanismes non explorés dans notre étude peuvent également être considérés comme l'incorporation d'AA et de DHA dans des espèces moléculaires spécifiques de lipides/glycérophospholipides ou des domaines membranaires spécifiques, la régulation par AA ou DHA de l'expression de gènes spécifiques et/ou l'interaction avec des récepteurs membranaires (Marion-Letellier et al., 2015).

Dans l'étude 2, nous avons démontré pour la première fois la présence du DOPG dans les deux formes du parasite. Le BMP est localisé au niveau du kinétoplaste et du flagelle chez la forme promastigote tandis qu'il est retrouvé au niveau de la vacuole parasitophore et du cytoplasme dans la forme amastigote. L'espèce majoritaire du BMP identifié chez *Leishmania* est le 16:0/16:0-BMP, à contrario chez les mammifères l'espèce majoritaire la plus souvent détectée est le 18:1/18:1-BMP (Besson et al., 2006 ; Bouvier et al., 2009 ; Luquain et al., 2000).

Afin d'évaluer le rôle du BMP des macrophages dans l'infection par *Leishmania*, un modèle de supplémentation avec le précurseur DOPG a été utilisé dans le but d'induire une augmentation du BMP intracellulaires. Différents temps d'infection ont été testés : l'association, l'infection et la survie.

Après supplémentation en DOPG des macrophages J774, qui conduit à un doublement de la quantité de BMP, les taux d'infection augmentent après 2h et 24h pour la souche MON-24 et seulement après 24h pour la souche MON-1. De la même façon est observée une augmentation des charges parasitaires après 2h et 24h ainsi que pour la survie. Nos résultats indiquent donc un effet facilitateur de la supplémentation en DOPG sur l'infection par les deux souches MON-1 et MON-24. Le suivi de l'infection à différents temps montre un doublement de la charge parasitaire au niveau de la survie pour les deux souches tandis que les effets sont différents au niveau des étapes précédentes suggérant que la supplémentation en DOPG régule davantage la survie du parasite.

Nos différentes observations semblent être en faveur d'un rôle du BMP dans l'infection, cependant ces données doivent être confirmées par des expériences complémentaires afin d'élucider le mode d'action du BMP. Plusieurs pistes d'investigations peuvent être avancées, notamment la nécessité du BMP des macrophages dans le transfert du cholestérol de l'hôte vers le parasite, en particulier au niveau de la vacuole parasitophore, favorisant sa multiplication et sa survie. Les travaux de l'équipe ont clairement démontré que le BMP régule le transport et le métabolisme du cholestérol dans les macrophages (Arnal-Levron et al., 2019; Delton-Vandenbroucke et al., 2007; Luquain-Costaz et al., 2013) et de nombreux travaux ont mis en évidence la nécessité du cholestérol de l'hôte dans l'infection à *Leishmania*. En effet, la phagocytose dépend de taux normaux de cholestérol dans la membrane plasmique (Pucadyil et al., 2004; Pucadyil and Chattopadhyay, 2006). Une autre hypothèse est que le BMP pourrait favoriser la formation de la vacuole parasitophore. Des études d'imageries peuvent être alors envisagées afin de déterminer la localisation du BMP au niveau de la vacuole parasitophore. Celle-ci étant constituée de vésicules de la voie endocytique, certains marqueurs des endosomes y ont été identifiés, notamment les marqueurs des endosomes précoces et tardifs EEA1, Lamp 1 et Lamp2 (Liévin-Le Moal and Loiseau, 2016; Rodríguez et al., 2006). Différents marquages peuvent être envisagés avec l'anticorps anti-BMP associé à différents anticorps des endosomes précoces et tardifs.

Les macrophages jouent un rôle déterminant dans la réponse à l'infection. Déterminer le profil des macrophages M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) supplémentés ou non après infection par les promastigotes par dosage de cytokines permettrait de comprendre d'avantage l'implication du BMP dans l'infection. De même que de doser l'arginine et le NO impliquer dans le contrôle de l'infection.

D'après l'ensemble de nos observations, il s'avère que la souche MON-24 répond davantage à la supplémentation en acide gras, au moins en ce qui concerne la production des métabolites oxygénés et l'infection ainsi qu'à la supplémentation en DOPG. Nos données mettent en exergue la souche MON-24 comme modèle pour les manipulations futures, notamment pour l'étude des mécanismes biochimiques de l'effet des lipides sur le comportement du parasite et sur son pouvoir infectant. Cette souche est d'autant plus intéressante qu'elle peut changer de tropisme. En effet, des études ont rapporté des changements de tropisme dans le cas de MON-24 notamment dans les coïnfections *Leishmania*/VIH. Le tropisme est passé de leishmaniose cutanée à viscérale (Kuhls et al., 2008). Ce changement de tropisme a aussi été observé chez des enfants immunocompétents en Tunisie (Aoun et al., 2001; Kallel et al., 2008)(Aoun et al., 2001 et Kallel et al., 2008).

*Partie V*

*Annexes*

## *Annexe I : ORP et infection*

### **I. Introduction**

Les oxystérols sont des composés produits par l'oxydation du cholestérol. Ils sont associés à une grande variété d'effecteurs cellulaires. Parmi ces effecteurs, on retrouve la protéine de liaison à l'oxystérol (OSBP) et les protéines apparentées à l'OSBP (ORP). Les ORP constituent une famille de protéines de liaison/transfert des lipides chez les eucaryotes. Plusieurs travaux ont mis en évidence le rôle des ORP dans le trafic et l'homéostasie du cholestérol intracellulaire : le métabolisme des lipides neutres (ORP2), le métabolisme des lipides des macrophages et des lipoprotéines de haute densité (ORP8) et l'adipogenèse (ORP11) (Kentala et al., 2016; Pietrangelo and Ridgway, 2018).

Un autre effecteur important des oxystérols est le BMP. Des travaux antérieurs du laboratoire ont en effet montré que l'augmentation de BMP cellulaire diminue la production intracellulaire des oxystérols dans des macrophages incubés avec des LDL oxydées. Les effets apoptotiques des LDL oxydées sont aussi diminués (Arnal-Levron et al., 2019). Cet effet protecteur du BMP sur la production d'oxystérols apoptotiques est dépendant de l'expression de ORP11 dans les macrophages : en effet, il est aboli dans des macrophages RAW silencés pour ORP 11. L'extinction de ORP11 conduit en outre à une réduction de l'efflux du cholestérol corrélée à une augmentation de la quantité cellulaire de cholestérol libre. Ces observations ont suggéré que ORP11 pourrait être à l'origine d'une nouvelle voie de transport non vésiculaire du cholestérol impliquant le BMP (Arnal-Levron et al., 2019).

Le cholestérol joue un rôle crucial dans l'infection à *Leishmania*. Le cholestérol membranaire des cellules hôtes est en effet nécessaire à l'entrée du parasite dans les macrophages. Différentes études ont mis en évidence le rôle du cholestérol de l'hôte en utilisant différentes molécules qui perturbent la distribution et/ou la synthèse de cholestérol dans les macrophages. Dans le cas d'un traitement avec la méthylbetacyclodextrine (M $\beta$ CD) qui déplete le cholestérol membranaire et perturbe les radeaux lipidiques, une inhibition de la phagocytose des promastigotes de *L. donovani* ainsi qu'une diminution de leur capacité de réplication sont observées (Rodríguez et al., 2006).

La lovastatine, qui inhibe l'enzyme HMG-CoA réductase, entraîne une réduction de l'entrée des parasites de *L. donovani* et une diminution de la charge d'amastigotes intracellulaires (Kumar et al., 2016). Il a également été rapporté que les parasites *Leishmania* entravent le trafic du cholestérol des macrophages provoquant la rétention du cholestérol dans la vacuole parasitophore (Semini et al., 2017).

Compte tenu du rôle de plusieurs ORP dans la régulation du métabolisme et du trafic du cholestérol dans les macrophages et de l'importance du cholestérol pour l'entrée et la multiplication du parasite *Leishmania* dans ces cellules hôtes, nous nous sommes intéressés au rôle des ORPs dans l'infection. Nous avons focalisé dans un premier temps nos études sur ORP11 en lien avec les travaux antérieurs de l'équipe. Pour cette étude nous avons utilisé la lignée de macrophages RAW 264.7 pour laquelle des modèles silencés pour plusieurs ORP ont été mis au point (Arnal-Levron et al., 2019)

## **II. Matériels et méthodes**

### **1. Culture des promastigotes**

Deux isolats de souches humaines de *Leishmania infantum*, MON-1 responsables de la LV et MON-24 responsable de la LC ont été utilisés. Les souches LV ont été isolées à partir de la moelle osseuse ou de leucocytes sanguins et les souches CL ont été isolées à partir de la sérosité cutanée. Des primocultures de promastigotes ont été réalisées en milieu biphasique Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) à 26 ° C avec repiquage toutes les semaines pendant 5 semaines consécutives. L'identification des isolats a été réalisée par électrophorèse des iso enzymes. Les souches ont été prélevées en Tunisie et le protocole a été revu et approuvé par le comité d'éthique de l'Institut Pasteur de Tunis, Tunisie. Les promastigotes sont cultivés à 26 ° C dans du milieu TC-199 (GE Healthcare, Pasching, Autriche) supplémenté avec 20% de sérum bovin fœtal et 100 ug / ml de pénicilline / streptomycine (Dutscher).

## **2. Culture des macrophages**

Nous avons utilisé les modèles de macrophage RAW 264.7 silencés pour ORP11 (sn ORP 11 -/-) et ORP3 (sn ORP3-/-) mis au point par Arnal-Levron M et al., 2019). Les RAW 264.7 sh NT sont des RAW 264.7 présentant un plasmide témoin. Les macrophages ont été cultivés dans du MEM additionnée d'acides aminés non essentiels, 10% de sérum veau foetal (SVF) (Dutscher St Quentin Fallavier, France), 25 µg / ml de nanomycopulitine (Dutscher) et 100 µg / ml de pénicilline / streptomycine (Dutscher). Les cultures ont été réalisées à 37 ° C avec 5% de CO<sub>2</sub>.

## **3. Infection des macrophages**

Les macrophages ont étéensemencés dans du MEM sur des lames de verre dans des plaques à 24 puits à une densité de 70 000 cellules par puits (à l'exception d'un test à plus fort taux d'ensemencement) et cultivés à 37 ° C pendant 24 heures. Les conditions d'infection ont été mises au point en faisant varier le ratio parasite/cellules et la durée d'infection. Les cellules ont ensuite été lavées 3 fois avec du PBS, fixées dans du paraformaldéhyde à 4% et colorées avec du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) (Life Technologies, Paisley, UK). Les lames ont été observées par microscopie à fluorescence pour compter les cellules infectées et non infectées ainsi que les amastigotes intracellulaires. Pour chaque lame, un total de 500 cellules a été observé dans plusieurs champs choisis au hasard. L'infectivité des parasites a été évaluée par le pourcentage de cellules infectées par rapport au nombre total de cellules comptées et par le nombre total d'amastigotes intracellulaires (charge parasitaire).

# **III. Résultats**

## **1. Mise au point de l'infection des RAW vs RAW NT**

Les premières expériences réalisées sur les macrophages RAW 264.7 ont révélé un faible taux d'infection, ne dépassant pas 30%, lors des infections avec un ratio parasite/cellule de 30 :1 pendant 24h. Dans des conditions similaires, le taux d'infection des J774 atteint environ 50%. Différentes conditions ont donc été testées afin de mettre au point le protocole d'infection des RAW 264,7 et obtenir un taux d'infection plus élevé.



Les paramètres qui ont été modifiés sont :

- Le nombre de cellulesensemencées par puits
- Le nombre de parasite par macrophage (10:1, 30:1)
- Le temps d'infection : 24h et 48h
- L'activation des macrophages avant l'infection par les promastigotes

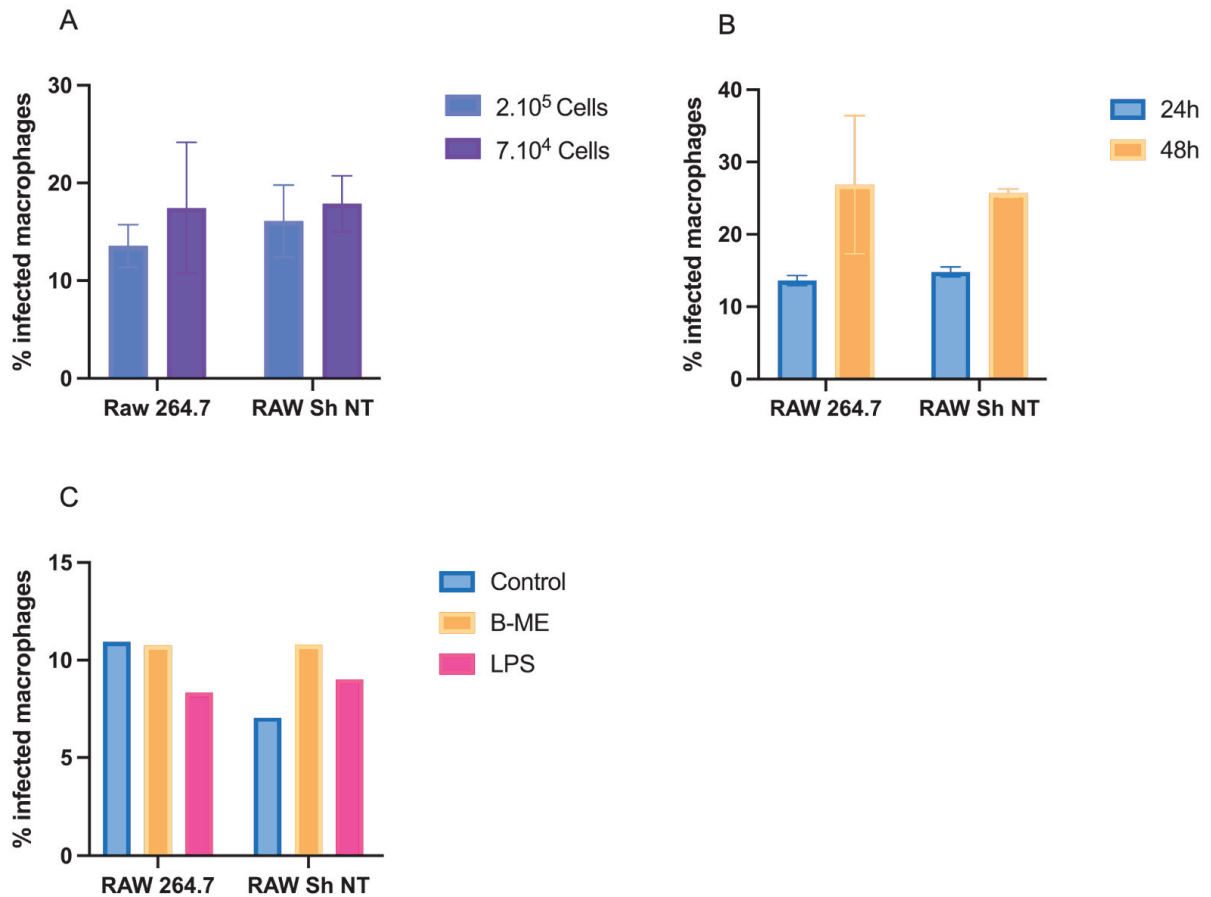
Selon plusieurs protocoles de manipulations avec des cellules RAW 264.7 les puits étaientensemencés avec 100 000 ou 200 000 cellules par puits (Ghosh et al., 2014; Nadaes et al., 2020). Afin d'optimiser notre protocole d'infection nous avons comparé le pourcentage de macrophage infecté avec 70 000 cellules par puits contre 200 000 cellules par puits. Nos résultats démontrent une meilleure infection lorsque les cellules sontensemencées à un ratio de 70 000 cellules par puits (Figure 53A).

Pour les tests suivants, nous avons modifié le ratio de parasites par cellules. En effet, après avoir réalisé des manipulations avec un ratio de 30:1, nous nous sommes aperçus que malgré la proportion élevée de parasites, le niveau d'endocytose restait très faible avec une majorité de parasites non internalisés. Les images de microscopie à fluorescence ont montré que les parasites restaient sous forme promastigote dans le milieu de culture. Ces conditions rendant la lecture et le comptage difficile et étant donc source d'erreur, nous avons appliqué le ratio de parasites par cellule 10:1 couramment utilisé.

Nous avons ensuite fait varier le temps d'infection. Les macrophages RAW 264.7 et Sh NT ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 pendant 24 h ou 48h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Comme le montre la figure 53B, le pourcentage de macrophages infectés est augmenté avec un temps d'infection de 48h.

Les différentes conditions testées n'ont pas permis d'atteindre un niveau d'infection élevé, de l'ordre de 50%. Nous avons donc recherché si l'activation préalable des macrophages avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol ou du LPS pouvait potentialiser l'entrée des parasites. Les macrophages ont été infectés avec les promastigotes de la souche MON-1 à un ratio de 10:1 parasites par cellules pendant 48h après pré-incubation de 24h avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol à  $1.10^{-4}$  M ou du LPS à 100ng/ml. Comme le montre la figure 53C, aucun de ces traitements ne modifie le taux d'infection.

En conclusion, les taux d'infection des RAW 264.7 ne dépassent pas les 30% quelles que soient les conditions testées. Nos résultats sont conformes à ceux rapportés par Nadaes et al., 2020, avec des taux d'infection inférieurs à 10% chez des macrophages RAW 264.7 infectés par *L. infantum* à un ratio de 5:1 parasites par cellule pendant 24h.



**Figure 53. Pourcentage de macrophages infectés entre les RAW 264,7 et les RAW sh NT.**

(A) Les macrophages RAW 264.7 et Sh NTensemencés à  $2.10^5$  ou  $7.10^4$  ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et pendant 24 h à un ratio de 30:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du pourcentage de macrophages infectés (n=1, en duplicat). (B) Les macrophages RAW 264.7 et Sh NT ont été infectés avec des promastigotes MON-1 pendant 24 h ou 48h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du pourcentage de macrophages infectés (n=1, en duplicat). (C) Les macrophages RAW 264.7 et RAW Sh NT ont été infectés avec des promastigotes MON-1 pendant 48h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du pourcentage de macrophages infectés (n=1, en duplicat).

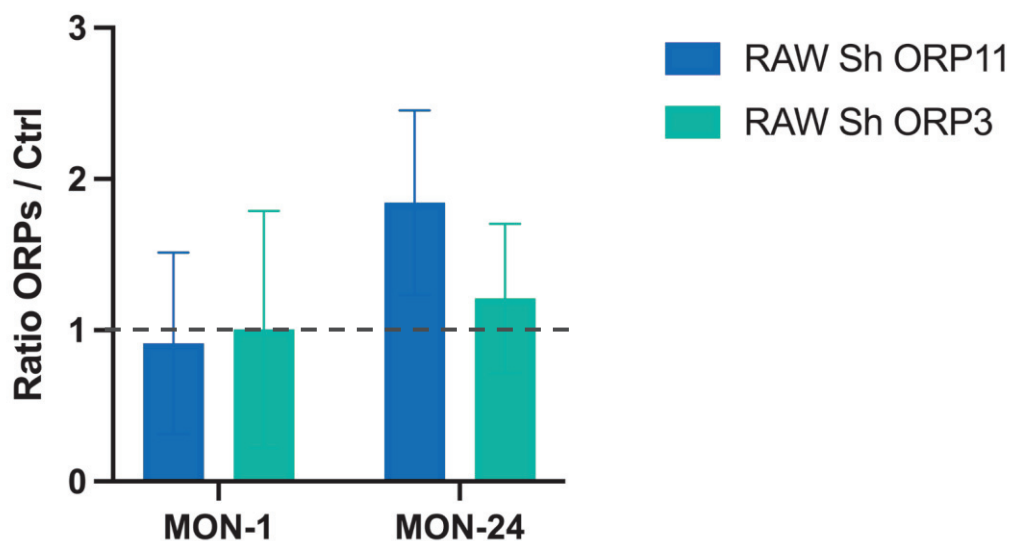
B-ME :  $\beta$ -mercaptoéthanol, LPS : lipopolysaccharide.

## 2. Effet de l'ORP 11<sup>-/-</sup> sur l'infection

Parallèlement à la mise au point du protocole d'infection des RAW 264.7, nous avons examiné les effets de la mutation de ORP11. Une mutation sur ORP3 a été choisie comme contrôle, ORP3 n'étant pas reliée au métabolisme ni au trafic du cholestérol. Différentes conditions expérimentales ont été appliquées avec des temps d'infection variables : 2h pour l'association, 24h pour l'infection et 48h pour la survie (24h d'infection + 24h supplémentaire dans le milieu de culture).

### a. Après 2h d'infection

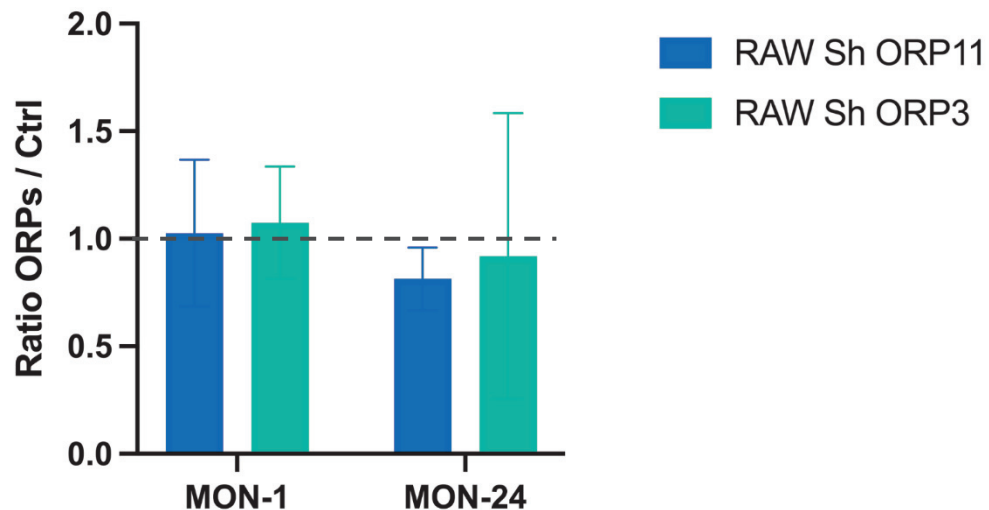
Les taux d'infection par les 2 souches de *Leishmania* sont d'environ 4 chez les macrophages témoins ShNT et environ 5% chez les macrophages ORP11<sup>-/-</sup> et ORP3<sup>-/-</sup>. Nos résultats ne révèlent pas de changement significatif de la charge parasitaire des macrophages ORP11<sup>-/-</sup> et ORP3<sup>-/-</sup> par rapport aux macrophages ShNT après 2h d'infection (Figure 54).



**Figure 54. Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11<sup>-/-</sup> et ORP 31<sup>-/-</sup>.** Les macrophages RAW 264.7 ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 2h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages ORP 11<sup>-/-</sup> et ORP 3<sup>-/-</sup> sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins (sh NT) et sont la moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences indépendantes.

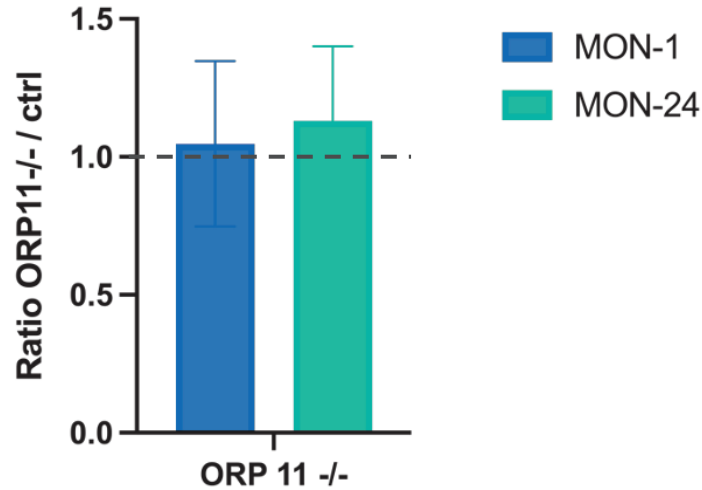
### b. Après 24h d'infection

Dans la figure 55, nos résultats ne révèlent pas de changement significatif sur l'infection des macrophages ORP11  $-/-$  et ORP3  $-/-$  par rapport aux macrophages ShNT après 24h d'infection. Les taux d'infection sont d'environ 10 % chez les macrophages ShNT, ORP 11  $-/-$  et ORP 3  $-/-$ .



**Figure 55. Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11 $-/-$  et ORP 31 $-/-$ .** Les macrophages RAW ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 24h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages ORP 11  $-/-$  et ORP 3  $-/-$  sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins (sh NT) et sont le  $\pm$  SD moyen de 3 expériences indépendantes.

Nous avons aussi testé le ratio 30:1 et confirmé l'absence d'effet de la mutation ORP11  $-/-$  (Figure 56 et tableau 5).



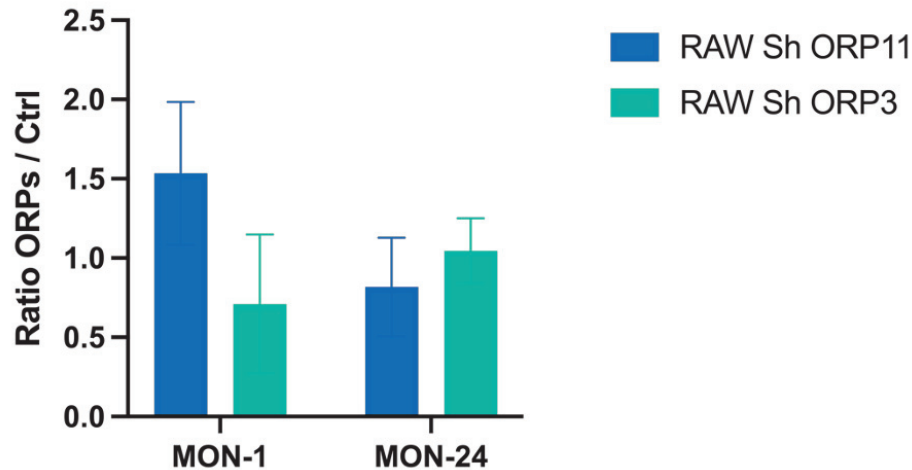
**Figure 56. Charge parasitaire chez les macrophages RAW sh ORP 11-/-.** Les macrophages RAW ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 24 h à un ratio de 30:1 parasites/cellule. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages ORP 11 -/- sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins (sh NT) et sont le  $\pm$  SD moyen de 4 expériences indépendantes.

**Tableau 5. Pourcentage de macrophages RAW sh NT et RAW ORP 11-/- infectés par des promastigotes MON-1 et MON-24.** Les données sont exprimées en pourcentage et le  $\pm$  SD moyen de 4 expériences indépendantes.

	MON-1 (%)	MON-24 (%)
RAW sh NT	30,7 $\pm$ 11,63	30,67 $\pm$ 10,4
RAW ORP 11-/-	30,18 $\pm$ 9,28	31,21 $\pm$ 13,8

### c. Évaluation de la survie intramacrophagique

Dans la figure 57, nos résultats ne révèlent pas de changement significatif sur la survie des macrophages ORP11  $-/-$  et ORP3  $-/-$  par rapport aux macrophages témoins.



**Figure 57. Charge parasitaire chez les macrophages ORP 11 $-/-$  et ORP 31 $-/-$ .** Les macrophages RAW ont été infectés avec des promastigotes des souches MON-1 et MON-24 pendant 24h à un ratio de 10:1 parasites/cellule. Après 2 lavages au PBS les cellules sont maintenues en culture 24h supplémentaire. Les données sont exprimées sous la forme du rapport de la charge parasitaire chez les macrophages ORP 11  $-/-$  et ORP 3  $-/-$  sur la charge parasitaire chez les macrophages témoins (sh NT) et sont le  $\pm$  SD moyen de 3 expériences indépendantes.

## IV. Conclusion

Les travaux exposés ici ont visé à examiner les conséquences des mutations de ORP11 ou ORP3 chez les macrophages sur l'infection par les souches de *L. infantum* MON-1 et MON-24. Nos résultats ne montrent aucun effet significatif de la mutation de ORP11 ou ORP3, que ce soit au niveau du taux d'infection ou de la charge parasitaire, et ce quel que soit le stade de l'infection.

## V. Discussion

Dans cette étude dédiée au rôle potentiel des ORP dans l'infection par *Leishmania*, nous avons choisi d'utiliser le modèle de macrophages RAW 264.7 dont des souches mutées de ORP, ORP11 et ORP3. Il est connu que les taux d'infection d'une souche de parasite dans un type de macrophage sont assez variables du fait de la variation intrinsèque imprévisible et la virulence du parasite et du potentiel de multiplication intracellulaire.

Il nous a donc fallu dans un premier temps mettre au point les conditions d'infection des RAW 264.7 par les souches *L. infantum* sur lesquelles nous travaillons principalement au laboratoire (MON-1 et MON-24). L'ensemble des tests réalisés à fois sur les RAW 264.7 wild type et les souches mutées (ShNT, ORP11, ORP3) n'a toutefois pas permis d'atteindre un taux d'infection suffisamment élevé, rendant difficile l'interprétation des résultats quant au rôle de la mutation ORP11 dans l'infection.

Une étude a comparé les capacités de phagocytose de différentes lignées de macrophages infectés par *L. infantum* tels que les THP-1, les RAW 264.7, les J774 et les U937 ainsi que des macrophages primaires (macrophages dérivés de moelle osseuse de souris Swiss et BALB/c, cellules d'exsudat péritonéal primaire dérivées de souris (PEC) et des cellules mononuclées du sang périphérique humain (PBMC)). Une phagocytose rapide est observée pour les cultures primaires. Concernant les lignées cellulaires, le taux de phagocytose des J774 est légèrement supérieur à celui des RAW 264.7. Le taux de multiplication est plus élevé chez les J774 cultivés dans du RPMI-1640 que dans du milieu DMEM et plus important que chez les macrophages RAW 264.7 (Hendrickx et al., 2019).

Une autre étude a comparé l'infection de macrophage RAW 264.7 par *L. infantum* ou *L. amazonensis*. Après 2h d'infection, le pourcentage de macrophages infectés par *L. amazonensis* est de 17% contre 5% seulement avec *L. infantum*. De même à 24h, ou les taux d'infection sont de 22% et 7% respectivement pour *L. amazonensis* et *L. infantum*. Ces données corroborent nos résultats sur le faible taux d'infection des RAW 264.7 par *L. infantum* (Nadaes et al., 2020).

Afin d'augmenter le taux d'infection des RAW 264.7 par *L. infantum*, de nouvelles expériences peuvent être envisagées notamment en utilisant des amastigotes recueillis *ex vivo* ou en centrifugeant les plaques de cellules avec les parasites. L'utilisation d'amastigotes *ex vivo* fournit des taux d'infection plus élevés par rapport aux promastigotes métacycliques (Hendrickx et al., 2019).

La génération de promastigotes métacycliques d'isolats cliniques reste difficile du fait des différences spécifiques de la souche avec notamment des taux de croissance différents.

Nos résultats préliminaires semblent exclure un rôle des protéines ORP11 et ORP3 dans l'infection à *Leishmania*. Toutefois, ces observations doivent être analysées avec prudence compte tenu du très faible taux d'infection des macrophages RAW 264.7. En effet, dans l'hypothèse où ORP11 favoriserait le transfert du cholestérol des macrophages vers la vacuole parasitophore, son extinction pourrait entraîner une diminution de la charge parasitaire. Cet effet est difficile à mettre en évidence dans des conditions d'infection déjà très faible chez les macrophages contrôles (ShNT). Les travaux antérieurs de l'équipe ont impliqué la protéine ORP11 dans le métabolisme/transport de cholestérol régulé par le BMP. Plus précisément, il a été montré que le BMP régule la production intracellulaire de dérivés oxydés du cholestérol selon un mécanisme dépendant de ORP11. A noter toutefois que la mutation ORP11 seule est sans effet sur l'oxydation du cholestérol. Compte tenu de nos observations préliminaires qui suggèrent un rôle du BMP dans l'infection par *Leishmania*, il serait intéressant de rechercher l'implication de ORP11 dans ce processus.



## *Annexe II : Étude d'un nanovaccin orale contre l'Échinococcose.*

L'échinococcose kystique représente un problème de santé publique et d'élevage majeur en particulier dans les pays en développement. Elle est présente dans les pays tempérés, y compris en Amérique latine, en Océanie, sur l'ensemble du littoral de la mer Méditerranée, en Chine, en Afrique du Nord et de l'Est et en Australie. Cette zoonose est causée par l'ingestion du cestode *Echinococcus granulosus*. Le stade adulte est retrouvé entre les villosités de l'intestin grêle des carnivores canins, l'hôte définitif. La croissance du stade larvaire dans les organes tel que le foie et les poumons provoque des signes cliniques chez les hôtes intermédiaires : les moutons et les bovins. Les hommes sont des hôtes intermédiaires accidentels du parasite. Ces différents hôtes intermédiaires se contaminent en ingérant les œufs des vers adultes retrouvés dans les fèces de l'hôte définitif (Rossi et al., 2012).

Dans de nombreuses zones endémiques, des programmes de prévention et de lutte ont été instaurés. Des programmes d'éducation sanitaire des populations sont mis en place ainsi qu'une surveillance de l'abattage des animaux et le traitement répété des chiens domestiques avec le praziquantel (DRONCIT<sup>®</sup>) cependant ces programmes représentent une charge financière élevée pour les pays en développement.

Un vaccin contre l'hydatidose est donc une alternative souhaitable pour assurer la prévention à long terme de la maladie et compléter les programmes de lutte actuels. L'élaboration d'un vaccin recombinant administré par voie orale à un petit nombre de chiens permettrait de diminuer le nombre des vers adultes *d'Echinococcus granulosus* et, par conséquent, le nombre d'œufs infectieux. Cependant, la mise au point d'un tel vaccin est difficile du fait de la réponse immunitaire développée par l'hôte (Zhang and McManus, 2008).

Dans des travaux antérieurs, notre équipe de recherche a mis en évidence deux protéines recombinantes : EgTrp (*Echinococcus granulosus* tropomyosine) et EAg31 (*Echinococcus granulosus* paramyosine) en tant que candidat potentiel pour le vaccin. La vaccination chez le chien utilisant *Salmonella* génétiquement modifiée comme vecteur et produisant les antigènes recombinant EgTrp et EAg31 a réduit la charge des vers adultes d'environ 70-80% (Petavy et al., 2008). Malgré une bonne immunogénicité de ce vaccin, l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées comme système de distribution pourrait être considéré comme un problème environnemental et éthique.

Par conséquent, le développement d'un autre système d'administration orale des antigènes recombinants est un enjeu majeur dans la lutte contre *E. granulosus*.

La meilleure voie d'administration d'un vaccin contre *Echinococcus granulosus* est la voie orale permettant de cibler l'immunité mucoale et de faciliter la campagne de vaccination. Cependant, les antigènes protéiniques administrés doivent résister à l'environnement du tractus gastro-intestinal (TGI), persister dans la lumière intestinale afin d'adhérer suffisamment longtemps pour être phagocytés par les cellules de l'intestin. Les peptides et les protéines administrées par voie orale n'ont pas une bonne disponibilité à cause de leur instabilité dans le tractus gastro-intestinal entraînant une dégradation prématurée. Les nanoparticules polymères biodégradables sont une bonne alternative. Ce sont des vecteurs colloïdaux de taille comprise entre 10 et 100 nm et elles possèdent de nombreux avantages tels que la protection antigénique, une libération prolongée et la co-administration d'adjuvant (Zhao et al., 2014). Dans le cas de la vaccination orale, les nanoparticules permettent une stabilité dans le TGI, protègent les antigènes encapsulés de l'environnement gastro-intestinal tout en améliorant le transport à travers les muqueuses et permettent une vaccination plus ciblée au niveau des sites d'infection (Chadwick et al., 2010). Pour ces raisons, les nanoparticules représentent un bon système d'administration pouvant remplacer le système de Salmonella.

Des systèmes de délivrance d'antigènes à bases de nanoparticules ont fait l'objet de recherche et ont été testés en tant que nanovaccin dans différentes maladies tel que le paludisme (Moon et al., 2012) et la dengue (Hunsawong et al., 2015) avec des résultats prometteurs. Les deux polymères les plus utilisés sont le poly (D, L-lactide-co-glycolyde) (PLGA) et l'acide polylactique (PLA). Ce sont tous deux des polymères biodégradables approuvés par la FDA. Ce système est utilisé afin d'améliorer l'administration ciblée au niveau des cellules présentatrices d'antigènes (APC) comme les cellules dendritiques (DCs) et par conséquent d'augmenter la réponse immunitaire (Elamanchili et al., 2004). Ces cellules contrôlent une majeure partie de la réponse immunitaire adaptative en internalisant l'antigène via différents récepteurs et en les traitant via les voies du complexe majeur d'histocompatibilité (Sehgal et al., 2014).

A ce jour, l'équipe de recherche a mis au point un nouveau système d'administration vaccinal qui consiste en deux antigènes recombinants d'*E. granulosus* encapsulés dans des nanoparticules de polymère. Afin d'augmenter la réponse immunitaire ils ont ajouté à la formulation le monophosphoryle lipide A. Dérivé du lipopolysaccharide bactérien LPS et non toxique, c'est un puissant activateur des cellules dendritiques via les récepteurs Toll-like 4 qui a été approuvé par la FDA comme adjuvant vaccinal (Tyler et al., 2016).

Ce signal de danger induit une maturation des cellules dendritiques conduisant à la régulation des molécules MHC de classe II et co-stimulatrices CD80, CD86 et CD40, ainsi que la régulation de la sécrétion des cytokines inflammatoires (Ismaili et al., 2002).

Les nanoparticules de polymères ont une charge négative ce qui limite les interactions avec les surfaces cellulaires induisant une absorption plus faible. Pour faire face à cette charge négative, un polymère cationique peut être utilisé : le chitosan (Li et al., 2013). Le chitosan est un polymère naturel biocompatible, lentement biodégradable et non toxique. Il permet d'amplifier l'absorption de médicament macromoléculaire hydrophiles et possède des propriétés bioadhésives (Thanou et al., 2001). Il a également des propriétés gélifiantes lorsqu'il interagit avec des contre-ions ce qui facilite son utilisation dans l'enrobage de nanoparticules. Des recherches approfondies ont été menées sur le chitosan comme vecteur de vaccin. Il est employé pour une administration prolongée et ciblée de macromolécules.

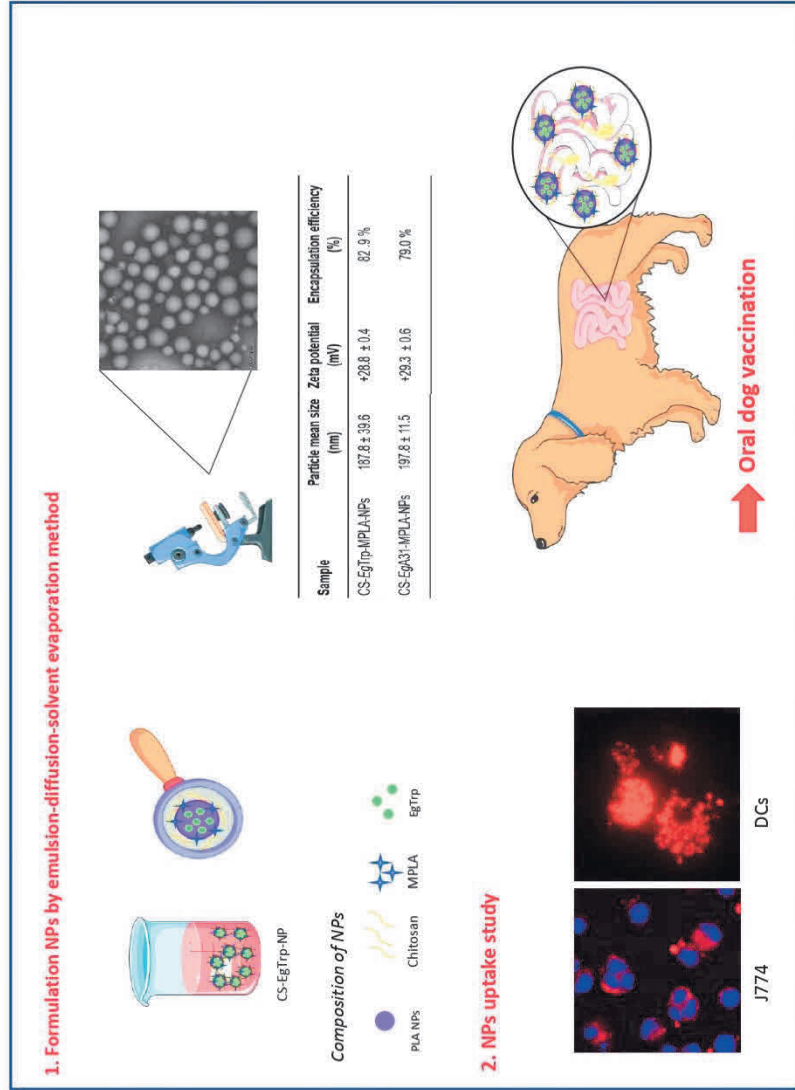
Ce nanovaccin (EgTrp et EAg31 encapsulées dans des nanoparticules de PLA, formulés avec le MPLA et enrobés de chitosan) a été testé sur des chiens et a montré des résultats encourageants (en cours de publication). De plus, des résultats préliminaires *in vitro* ont cependant montré une différence d'internalisation des nanoparticules dans les cellules dendritiques lorsque celles-ci sont enrobées de chitosan.

Pour cette étude, j'ai réalisé les manipulations suivantes :

1. Formulation du nanovaccin
  - a. Obtention de la protéine recombinante
    - Production de la protéine EgTrp
    - Purification de la protéine EgTrp
    - Dialyse
    - Electrophorèse
    - Lyophilisation
    - Dosage de la quantité de protéine par la méthode de Bradford
  - b. Obtention des nanoparticules
    - Préparations des nanoparticules
    - Modification de la surface des nanoparticules avec le chitosan
    - Caractérisation des nanoparticules
2. Effet du nanovaccin sur les cellules dendritiques de souris
  - a. Différenciation et activation des cellules dendritiques par les nanoparticules
    - Génération des dendritiques murines
    - Incubation des nanoparticules avec les cellules dendritiques
  - b. Etude de l'internalisation par les cellules dendritiques
3. Effet du nanovaccin sur les cellules Caco-2
  - a. Maintien de la culture
  - b. Incubation des nanoparticules avec les cellules
  - c. Observation au microscope électronique à transmission et microscopie à fluorescence

**International Journal for Parasitology**  
**Development of an oral nanovaccine for dogs against Echinococcus granulosus**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	IJPara21_474
<b>Article Type:</b>	Full Length Article
<b>Keywords:</b>	Polymeric nanoparticles; Chitosan, Echinococcus granulosus; Oral vaccine, Dog
<b>Corresponding Author:</b>	Samira Azzouz-Maache FRANCE
<b>First Author:</b>	Samira Azzouz-Maache
<b>Order of Authors:</b>	Samira Azzouz-Maache Marine Leroux Uruguaysito benavides imane Hellel-Bourtal cecilia Silvarrey nadège milhau thierry marchal philippe lawton stéphanie Briançon Anne-Françoise petavy samia lahmar adriana esteves eyad almouazen
<b>Abstract:</b>	Dogs are the main source of animal and human cystic echinococcosis caused by the Cestode parasite Echinococcus granulosus . Dog vaccination seems to be a good strategy to control this parasitic disease. Here we present the development of a polymeric nanoparticle-based oral vaccine for dogs against Echinococcus granulosus delivered in enteric-coated capsules. To achieve our target, we encapsulated two recombinant antigens into biodegradable polymeric nanoparticles in the presence of Monophosphoryl lipid A as an adjuvant to ensure efficient delivery and activation of a protective mucosal immune response. The formulated delivery system showed a nanoparticle size less than 200 nm with more than 80% antigen encapsulation efficiency and conserved integrity and immunogenicity. The nanoparticle surface was coated with chitosan to enhance adhesion to the gut mucosa and a subsequent antigen delivery. Chitosan-coated nanoparticles showed a higher cell internalization in murine macrophages and dendritic cells as well as a higher penetration into Caco-2 cells in vitro. Antigen-loaded nanoparticles were freeze-dried and enteric-coated capsules were filled with the obtained powder. The obtained results show a promising nanoparticles delivery system for oral vaccination.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Antonio Osuna Professor, Universidad de Granada - Campus Fuentenueva: Universidad de Granada aosuna@ugr.es for his expertise in the parasite vaccination  Laurence Millon lmillon@chu-besancon.fr for his expertise in the parasite Echinococcus  Philippe Legrand philippe.legrand@univ-montp1.fr for his expertise in nanotechnology



### Highlights

- Hydatid infection caused by the cestode *Echinococcus granulosus* is still one of the major zoonoses, affecting humans as well as domestic and wild animals worldwide.
- Vaccination of dogs, the main definitive hosts, may provide significant clinical and epidemical outcomes by arresting the development of adult tapeworms.
- Biodegradable polymeric particles (NPs) are promising vehicles for orally antigen delivery because their physicochemical properties can be adapted to the particular environment of the gastro-intestinal tract.
- The addition of chitosan increased the internalization of nanoparticles and promoted their adhesion to the mucosa.

1 Running header: *Echinococcus* nanovaccine development

2 **Development of an oral nanovaccine for dogs against *Echinococcus granulosus***

3 Marine Leroux<sup>1,2,4</sup>, Uruguaysito Benavides<sup>3</sup>, Imène Hellel-Bourtal<sup>1,4</sup>, Cecilia Silvarrey<sup>5</sup>, Nadège  
4 Milhau<sup>6</sup>, Thierry Marchal<sup>6</sup>, Philippe Lawton<sup>1,2,4</sup>, Stephanie Briançon<sup>1,4</sup>, Anne-Françoise Petavy<sup>1,2</sup>,  
5 Samia Lahmar<sup>7</sup>, Adriana Esteves<sup>5</sup>, Eyad Almouazen<sup>1,4</sup> and Samira Azzouz-Maache<sup>1,2,4\*</sup>

6 1. Univ Lyon, Université Claude-Bernard Lyon I, ISPB-Faculté de Pharmacie, Lyon, France

7 2. Institut de recherche pour le développement (IRD), UMR InterTryp IRD/CIRAD, campus  
8 international de Baillarguet, Montpellier, France

9 3. Academic Unit of Immunology and Immunotherapy, Faculty of Veterinary Medicine,  
10 Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

11 4. Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, LAGEPP UMR 5007, F-69100,  
12 Villeurbanne, France

13 5. Biochemistry Section, Faculty of Sciences, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

14 6. UPSP ICE, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon, 1 avenue Bourgelat, F-69280 Marcy  
15 L'Etoile, France

16 7. National School of Veterinary Medicine, Sidi Thabet, Tunisia

17 \*Corresponding author: Samira AZZOUZ <samira.azzouz-maache@univ-lyon1.fr>

18

19 **Key words**

20 Polymeric nanoparticles; Chitosan, *Echinococcus granulosus*; Oral vaccine, Dog

21

22 **Abstract**

23 Dogs are the main source of animal and human cystic echinococcosis caused by the Cestode  
24 parasite *Echinococcus granulosus*. Dog vaccination seems to be a good strategy to control this  
25 parasitic disease. Here we present the development of a polymeric nanoparticle-based oral vaccine  
26 for dogs against *Echinococcus granulosus* delivered in enteric-coated capsules. To achieve our  
27 target, we encapsulated two recombinant antigens into biodegradable polymeric nanoparticles in the  
28 presence of Monophosphoryl lipid A as an adjuvant to ensure efficient delivery and activation of a  
29 protective mucosal immune response. The formulated delivery system showed a nanoparticle size



30 less than 200 nm with more than 80% antigen encapsulation efficiency and conserved integrity and  
31 immunogenicity. The nanoparticle surface was coated with chitosan to enhance adhesion to the gut  
32 mucosa and a subsequent antigen delivery. Chitosan-coated nanoparticles showed a higher cell  
33 internalization in murine macrophages and dendritic cells as well as a higher penetration into Caco-  
34 2 cells in vitro. Antigen-loaded nanoparticles were freeze-dried and enteric-coated capsules were  
35 filled with the obtained powder. The obtained results show a promising nanoparticles delivery system  
36 for oral vaccination.

37

### 38 **1. Introduction**

39 Hydatid infection caused by the cestode *Echinococcus granulosus* (*E. granulosus*) is still one of the  
40 major zoonoses, affecting humans as well as domestic and wild animals worldwide (Thompson &  
41 Jenkins, 2014). The parasite requires two mammalian hosts to complete its life cycle. The adult worm  
42 develops in the intestine of the definitive host (dogs), and the eggs are shed with the host's feces.  
43 They are able to infect a wide variety of intermediate hosts (herbivorous and omnivorous animals)  
44 including humans that are accidentally infected. The development of the eggs to larval stages  
45 throughout the internal organs, especially the liver and lungs, causes Hydatid Disease. *E. granulosus*  
46 is distributed worldwide and the WHO has estimated that more than 1 million people are affected by  
47 echinococcosis at any one time for around US\$ 3 billion of annual costs for treating cases and losses  
48 to the livestock industry. Control programs developed in several countries using antiparasitic drugs  
49 in sheep or dogs gave limited results in stopping the infection and the disease's frequency  
50 (Torgerson & Heath, 2003).

51 Vaccination could be the most effective strategy to control this infection. Vaccination of dogs, the  
52 main definitive hosts, may provide significant clinical and epidemical outcomes by arresting the  
53 development of adult tapeworms (Pourseif et al., 2018). Several authors have demonstrated that  
54 dogs can develop a protective immunity against *E. granulosus* through repetitive natural infections  
55 (Gemmell, 1962; Movsesijan et al., 1968) or by immunization with native proteins (Zhang et al., 2006)  
56 suggesting that it is possible to develop a vaccine using parasite recombinant antigens to develop  
57 protective immunity.

58 Vaccination at the site of infection is highly desirable to obtain a local mucosal defense at the entry  
59 pathways of pathogens. Indeed, mucosal delivery is the only vaccination route that induces both  
60 mucosal and systemic immune responses, especially if the vaccine contains adjuvants,  
61 immunostimulators or carriers. Locally produced secretory IgA constitute over 80% of all antibodies  
62 produced in mucosa-associated tissues and are considered to be among the most important  
63 protective humoral immune factors. However, induction of a robust protective immune response by  
64 oral immunization requires successful delivery of the intact and active antigen to Antigen Presenting  
65 Cells (APCs) of the intestine mucosa (Vela Ramirez et al., 2017). To be effective, the antigen delivery  
66 system must: (i) protect the antigen from the highly acidic environment of the stomach (pH 1-3) and  
67 from the presence in the duodenum and jejunum of proteolytic enzymes responsible for protein  
68 degradation, (ii) ensure transport of the antigen across the mucosal barrier, to APCs, and (iii),  
69 enhance the immune responses elicited via adjuvants.

70 In previous works, our team has identified two recombinant proteins *EgTrp* (*E. granulosus*  
71 tropomyosin) and *EgA31* (*E. granulosus* paramyosin) as potential vaccine candidates (Esteves et  
72 al., 2003; Fu et al., 1999). Recombinant antigens were tested for their immunogenic properties  
73 confirming the interest to use them for future vaccine development (Saboulard et al., 2003; Pétavy  
74 et al., 2008). Furthermore, our first vaccination trials in dogs using these recombinant proteins  
75 administered orally induced a high level of protection with high immunogenicity and decreased the  
76 parasite burden by more than 70% (Pétavy et al., 2008). This vaccine system using an attenuated  
77 *Salmonella* delivery system expressing both recombinant antigens could be considered as an  
78 environmental problem (Karch & Burkhard, 2016). For these reasons, developing a safer alternative  
79 vaccine delivery system for these recombinant antigens, suitable for dog oral administration could  
80 be an interesting strategy in the control plans against *E. granulosus*.

81 Biodegradable polymeric nanoparticles (NPs) have been described as a potential antigen delivery  
82 system for systemic and mucosal vaccine development (Zhao et al., 2014). For these reasons, we  
83 decided to develop a robust antigen delivery system based on nanoparticles. As a matter of fact,  
84 polymeric particles are promising vehicles for orally antigen delivery because their physicochemical  
85 properties can be adapted to the particular environment of the gastro-intestinal tract. We previously

86 reported the feasibility to encapsulate *EgTrp* as antigen and the monophosphoryl lipid A (MPLA) as  
87 adjuvant in polymeric NPs. The developed system was evaluated *in vitro* on canine monocyte-  
88 derived dendritic cells (cMoDC) confirming the ability of such a system to deliver the antigen and  
89 induce cMoDC maturation and autologous T CD4+ proliferation more efficiently than the antigen  
90 alone (Milhau et al., 2020).

91 In the present work, we report the design of an oral vaccine delivery system using the two  
92 recombinant antigens (*EgTrp* and *EgA31*), with a coating of the MPLA-NPs with chitosan (CS) and  
93 by testing enteric-coated capsules to protect the freeze-dried antigen-loaded CS-MPLA-NPs. The  
94 interactions of this nanoparticle delivery system were evaluated on Caco-2 cells (a human intestinal  
95 cell line), mouse macrophages (J774A cell line) and mouse dendritic cells to observe the effect of  
96 chitosan.

97 Chitosan is a cationic polysaccharide with advantageous properties for oral delivery, including  
98 enhanced mucoadhesion through interactions between the positive charges of the polymer and the  
99 negatively charged intestinal cells membrane, and an ability to facilitate antigen transport across the  
100 mucosal barrier either through a paracellular route by a reversible disruption of epithelial tight  
101 junctions or via transcytosis through enterocytes (Xia et al., 2015). However, chitosan coating is  
102 limited by its high solubility in acidic conditions and must be protected from gastric hyper-acidity.  
103 Consequently, we tested different enteric-coated capsules to complete this formulation. Enteric-  
104 coated capsules must protect NPs from the highly acidic conditions of the stomach, but must be  
105 rapidly dissolved in the less acidic condition of the duodenum to release NPs and allow chitosan to  
106 exert its effects.

107

## 108 **2. Materials and methods**

### 109 **2.1. Vaccine formulation**

#### 110 **2.1.1. Antigen production and purification**

111 The recombinant *EgTrp* antigen was produced as previously described (Milhau et al., 2020).  
112 *pQIA-EgTrp* was expressed in M15 (pREP4) (Qiagen) *Escherichia coli* strain. Bacterial cells  
113 containing the relevant expression plasmid were cultured at 37°C in yeast extract and tryptone media  
114 supplemented with ampicillin/kanamycin, up to 600 nm. *EgTrp* expression was induced by the

115 addition of 1.5 mM isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside and incubated for further 3 h. After  
116 centrifugation at 5,000 rpm for 25 min, the cells were collected and re-suspended in cell lysis buffer  
117 (50 mM phosphate buffer pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole) and ruptured by sonication. Cellular  
118 debris were removed by centrifugation at 15,000 x g for 30 min at 4°C, and the supernatant was  
119 loaded onto His-Trap column (GE Healthcare). Elution was performed in the same lysis buffer with  
120 increasing concentrations of imidazole (100 mM, 200 mM, 300 mM, 500mM).

121 The *EgA31* coding region cloned into the vector pET22b (NEB) was expressed in the  
122 *Escherichia coli* BL21 strain and the antigen was subsequently purified according to the same  
123 protocol as the one previously described for *EgTrp*, except that 8 M urea was used for the lysis and  
124 elution buffers. The eluted fractions were analyzed by SDS-PAGE using the PageRuler Prestained  
125 Protein Ladder (0 to 170 kDa - Thermo Scientific) as molecular weight markers and MALDI-TOF  
126 mass spectrometry.

127

#### 128 **2.1.2. preparation of recombinant antigen-loaded nanoparticles**

129 The two recombinant antigens were encapsulated separately into polymeric nanoparticles  
130 using the emulsion-diffusion-solvent evaporation method as described in our previous article (Milhau  
131 et al., 2020). First, poly (D,L) lactic acid (PLA) (Mw 20000, Evonik Biomaterials) was dissolved in 20  
132 mL of ethyl acetate at a final concentration of 5 %. The adjuvant MPLA (Monophosphoryl-lipid A from  
133 *Salmonella enterica* serotype Minnesota Re 595, Sigma-Aldrich) previously solubilized in a  
134 methanol-chloroform mixture (1:4 v/v) was then introduced into the organic phase with magnetic  
135 stirring. The first emulsion was made by adding dropwise the internal aqueous phase (about 4 mg  
136 of *EgTrp* or *EgA31* in 2 mL of their elution buffers) to the organic phase under magnetic stirring  
137 combined with sonication at a 25 % amplitude (S-4000, Misonix) for 2 minutes. The second emulsion  
138 was made by dropping the first emulsion in 40 ml of a polyvinyl alcohol (PVA, 31000 MW, Sigma-  
139 Aldrich) aqueous solution (2%) in the same conditions for another 2 min on ice. The final preparation  
140 was stirred for 20 minutes. Finally, the organic solvent was evaporated at 40°C and 200 mBar using  
141 a rotary evaporator (Rotavapor® RE-140, Büchi, Switzerland). The final nanoparticle suspension  
142 was adjusted to 40 ml final volume with demineralized water and was stored at 4°C for further use.  
143 Blank-MPLA-NPs were prepared in similar conditions by replacing the antigen and the elution buffer

144 by 2 mL of distilled water. For the evaluation of NPs internalization, Nile red (Sigma-Aldrich), a  
145 fluorescent marker, was added (4 mg of Nile Red per gram of PLA) to the organic phase and these  
146 Nile red marked nanoparticles (NR-MPLA-NPs) were prepared as described above.

147

### 148 **2.1.3. Preparation of Chitosan-coated nanoparticles**

149 In order to prepare Chitosan-coated nanoparticles (CS-MPLA-NPs), after organic solvent  
150 evaporation NPs were treated as described before by Wang et al.,(2013) after modifying the  
151 operative conditions. The NP suspension was first centrifuged at 28000 g for 15 min and the  
152 supernatant was decanted to eliminate the PVA. NPs were then suspended in CS (deacetylation  
153  $\geq 75\%$ , Sigma-Aldrich) in a hydrochloride acid aqueous solution and kept under magnetic stirring for  
154 different periods of time. The suspension was then centrifuged at 28000 g for 15 min, the supernatant  
155 was decanted to eliminate excess of CS and finally CS-MPLA-NPs were suspended in deionized  
156 water. Different chitosan concentrations (0.025 – 0.1%) and incubation periods (1, 4 or 24 hrs) were  
157 tested in order to obtain the optimal positive charge of NPs. The NPs used for *in vitro* and *in vivo*  
158 evaluations were prepared with the selected conditions using 0.1% of CS solution and 4 hrs of  
159 incubation.

160

### 161 **2.1.4. NP freeze-drying and capsule filling**

162 To ensure long term stability, CS-EgTrp-MPLA-NPs and CS-EgA31-MPLA-NPs were  
163 lyophilized and capsule-filled separately in order to avoid stability problems. Mannitol was added to  
164 the NP suspension at a final concentration of 2% as a lyoprotectant and a bulking agent. The NP  
165 suspension was frozen for 3 hrs at  $-80^{\circ}\text{C}$  before the sublimation step. Lyophilization was performed  
166 in laboratory-scale freeze-dryer (Alpha, Christ) at a shelf-temperature of  $-15^{\circ}\text{C}$  and a pressure of  
167  $500\ \mu\text{Bar}$  for 20 hrs. Hard capsules were then filled with the lyophilized NP containing 250  $\mu\text{g}$  of  
168 antigen per capsule and kept at room temperature. For this step two types of hard capsules were  
169 tested: hard gelatin capsules (Capsugel<sup>®</sup>) and hydroxypropyl methylcellulose capsules containing  
170 gellan gum (DRcaps, Capsugel<sup>®</sup>). Finally, enteric-coating was done by immersing the capsules in  
171 ethanol containing 6% of an anionic copolymer based on methacrylic acid and ethyl acrylate

172 (EUDRAGIT® L100-55). The disintegration and dissolution assays were performed as described in  
173 the European Pharmacopeia at acidic (pH 1.2) and alkaline (pH 6.8) conditions.

174

## 175 **2.2. Nanoparticle characterization**

### 176 **2.2.1. Average size, zeta potential and morphology**

177 The NPs average size, size distribution and zeta potential in an aqueous environment were  
178 investigated by dynamic light scattering and laser microelectrophoresis using the Zetasizer Nano  
179 ZS90 (Malvern Instruments, UK) at 25°C. Nanoparticles' morphology was observed by transmission  
180 electron microscopy (TEM) using a CM 120 microscope (Philips, Eindhoven, Netherlands) operating  
181 at an accelerating voltage of 80 KV. A drop of NP suspension was placed on a copper grid and  
182 stained by 1% of sodium silicotungstate in deionized water.

183

### 184 **2.2.2. Antigen encapsulation efficiency**

185 To evaluate the encapsulation efficiency, the NP suspension was centrifuged (28000 g for  
186 30 min) in order to separate the free antigen from the encapsulated one. Afterwards, the total amount  
187 of protein in the total formulation (T), the unencapsulated-protein in the supernatant (SN) and the  
188 encapsulated-protein in the pellet (P) were compared. Acetonitrile was used to dissolve the NP  
189 polymer and to extract the antigen. The protein obtained after this procedure was quantified with the  
190 Bradford reagent (Sigma-Aldrich). The encapsulation efficiency (EE) was then calculated as the  
191 percentage of the protein amount found in the pellet compared to the protein amount added to the  
192 process.

193

### 194 **2.2.3 Antigen integrity**

195 The extracts from the NP suspension, the supernatant and the pellet were also analyzed by  
196 12.5 % SDS-PAGE stained with Coomassie Blue to assess for their integrity. Recombinant *EgTrp*  
197 and *EgA31* treated or not with acetonitrile were used as controls. For Western Blot analysis, an anti-  
198 *EgTrp* rabbit immune serum was used.

199

## 200 **2.3. In vitro evaluation of interactions between nanoparticles and the intestinal environment**

201 **2.3.1. In vitro tests in acidic conditions**

202 To evaluate the antigen protection against gastrointestinal degradation, antigen-loaded  
203 MPLA-NP suspensions were first incubated in an aqueous solution at pH 1.6 and pH 6.8 simulating  
204 the gastric and intestinal conditions for 2 and 6 hours, respectively. Afterwards, they were incubated  
205 for 2 hrs in an artificial gastric environment containing pepsin (SGF) prepared according to the  
206 European Pharmacopeia recommendations.

207

208 **2.3.2. Interactions with Caco2 cells**

209 Caco-2 cells were seeded in a 6-well microplate at a density of  $6 \cdot 10^5$  cells/well in Dulbecco's  
210 Modified Eagle's Medium – high glucose containing 10% (v/v) foetal bovine serum (Sigma, St-  
211 Quentin Fallavier, France), 1% MycoKill AB (GE healthcare, Pasching, Austria) and 2 % Penicillin /  
212 Streptomycin (Dutcher, France) and incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hrs, they  
213 were incubated with NR-MPLA-NPs and CS-NR-MPLA-NPs at a final 1:100 dilution and observed  
214 by confocal laser scanning microscopy (Zeiss Axiovert 200M). For transmission electron microscopy,  
215 the cells were fixed with 4% glutaraldehyde in 0.2 M cacodylate buffer, pH 7.4, post-fixed with 1%  
216 osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, dehydrated in a  
217 graded series of acetone and embedded in Epon. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate  
218 and lead citrate and observed under a Jeol 1400 JEM transmission electron microscope (Tokyo,  
219 Japan) set at 120 kV.

220

221 **2.3.3. Interactions with mouse APC**

222 **2.3.3.1. Murine macrophages**

223 The cytotoxicity of NP preparations was tested on mouse J774A macrophages using the Cell-  
224 Titer 96 non-radioactive Cell Proliferation Assay (MTT) kit (Promega, Madison, WI, USA). The  
225 BALB/c mice cell line J774A.1 (European Collection of Cell Culture) was maintained at 37 °C with  
226 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 (Dutscher, France) containing 10% (v/v) foetal bovine serum (Sigma, St-

227 Quentin Fallavier, France), 1% MycoKill AB (GE healthcare, Pasching, Austria) and 1.5% Penicillin  
228 / Streptomycin (Dutscher, France). They were seeded in 96-well microplates in 50  $\mu$ L of Minimal  
229 Essential Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% Fetal Bovine  
230 Serum (Life Technologies) and incubated overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> until the cells covered 80  
231 to 90 % of the bottom of the well. After that, the macrophages were incubated for 24 hours with  
232 several formulation dilutions ranging from 1:10 to 1:1000.

233 **For uptake studies**, NR-MPLA-NPs and CS-NR-MPLA-NPs were used to track their  
234 internalization inside macrophages with a final dilution of 1:100. The macrophages were incubated  
235 for 2h with NPs and the medium was replaced. After 24h, the samples were counterstained with the  
236 nucleus-specific Hoechst 33342 fluorescent dye and observed by confocal laser scanning  
237 microscopy (Zeiss Axiovert 200M).

238

#### 239 **2.3.3.2. Murine bone marrow derived dendritic cells**

240 Bone marrow cells were obtained from femurs and tibias of C57BL/6 mice and treated with  
241 red blood cells lysis buffer. All mice were raised in SPF environment with free access to standard  
242 food and water. This study was approved by the Animal Ethics Committee of the University Claude  
243 Bernard of Lyon. The bone marrow cells were differentiated into DCs as described previously [19]  
244 by resuspension in RPMI-1640 culture medium containing 10% (v/v) foetal bovine serum (Sigma,  
245 St-Quentin Fallavier, France), 1% MycoKill AB (GE healthcare, Pasching, Austria) and 1% Penicillin  
246 / Streptomycin (Dutscher) with 20 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-  
247 CSF) (Sigma, USA) and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol. They were cultured for 5 days at 37°C with 5%  
248 CO<sub>2</sub> to ensure differentiation and obtain CD11c<sup>+</sup> cells. DCs were seeded on Lab-Tek II Chamber  
249 Slides™ 4-well Glass slides overnight at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. After 24 hrs, cells were incubated with  
250 NR-MPLA-NPs and CS-NR-MPLA-NPs at a 1:100 dilution for 24hrs, after which the medium was  
251 replaced. The cells were observed by fluorescent microscopy (LEICA DM400 B LED).

252

### 253 **3. Results**



254 **3.1. Characterization of the vaccine nanoparticles**

255 Both blank and antigen-loaded MPLA-NPs were obtained with a mean size near to 200 nm  
 256 (Table 1). All NP preparations showed a slight negative surface charge of about -3 mV. The  
 257 encapsulation efficiencies for the two antigens were near 85% (Table 1). Moreover, scanning  
 258 microscopy images confirmed the spherical shape and the measured size of the NPs (Fig. 1A, B and  
 259 C).

260 **Table 1** Characterization of antigen-loaded MPLA-NP prepared by the double emulsion technique.

261

Sample	Particle mean size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
Blank-MPLA-NP	201.5 ± 17.1	0.12 ± 0.03	-3.14 ± 1.40	–
<i>EgA31</i> -MPLA-NP	189.5 ± 11.2	0.22 ± 0.16	-2.92 ± 1.36	84.7 ± 3.2
<i>EgTrp</i> -MPLA-NP	185.0 ± 5.8	0.22 ± 0.16	-2.92 ± 1.36	85.6 ± 1.4

262

263 SDS-PAGE analysis was carried out on the antigen extracts from total NP suspension, the  
 264 supernatant and the pellet. The extraction method didn't alter the antigens' integrity since the antigen  
 265 had similar bands whether acetonitrile-treated or not (Fig. 1D and E). The molecular mass of the  
 266 antigens eluted from the NPs were consistent with their apparent molecular mass in the *EgTrp* (27  
 267 kDa) and *EgA31* (54 kDa) controls, evidencing a lack of impact of the encapsulation procedure on  
 268 the integrity of the two encapsulated antigens (Fig. 1D and E). We can conclude that a high  
 269 percentage of the antigens were encapsulated into NPs without alteration of their integrity. The  
 270 antigens' integrity was also assessed after submitting *EgTrp*-MPLA-NPs and *EgA31*-MPLA-NPs to  
 271 gastric (pH 1.6) and intestinal (pH 6.8) conditions for 2 and 6 hours with no alteration (supplementary  
 272 S1). These observations indicate the potential of the nanoparticles in antigen protection against  
 273 enzymatic degradation.

274 Different chitosan concentrations and incubation periods were tested regarding positive Zeta  
 275 potential to find out the optimal parameters for high CS coating. Figure 2A shows that incubation of

276 blank-MPLA-NPs with 0.1% CS for 4 hours was the most appropriate condition for surface  
277 modification with a highest positive value (+ 30 mV) of the Zeta potential. Under these conditions,  
278 CS-coated blank-MPLA-NPs displayed a positive surface charge until pH 7 with 8.6 mV measured  
279 at pH 5.5 (Fig 2B) and kept their spherical shape as showed by transmission electron microscopy  
280 (Fig 2C). The chitosan-coating of *EgTrp*-MPLA-NPs and *EgA31*-MPLA-NPs was then successfully  
281 performed using the conditions selected above and the properties of these CS-MPLA-NPs containing  
282 *EgTrp* and *EgA31* are shown in Table 2. Their positive surface charge and the conserved antigen  
283 integrity are shown in Table 2 and Figures 2D and E. The encapsulation efficiency was slightly  
284 decreased during this step because of NPs loss during the centrifugation step.

285

### 286 **3.2. Elaboration and characterization of an oral vaccine form**

287 It was important to verify that capsule-filled with freeze-dried NPs keep their size distribution,  
288 their positive surface charges and particularly the integrity of the entrapped antigen in order to  
289 confirm the oral vaccine efficiency. We observed that freeze-drying did not alter NP characteristics.  
290 As shown in figure 3A, a similar size distribution was observed after reconstitution of the lyophilizate  
291 in water. Different types of hard capsule were tested and the gelatin-based capsules altered NP size  
292 distribution after the dissolution test, due to their high moisture content not adapted for storage of  
293 the freeze-dried NP (Data not shown). Conversely, the hydroxypropyl methylcellulose-based  
294 capsules containing gellan gum were more adapted and were selected for their low moisture content  
295 and their delayed release that ensure long term storage of lyophilized NPs and an enhanced gastric  
296 resistance coating film, respectively.

297 Eudragit® L100-55-coated capsules displayed good gastric resistance at pH 1.2 for 2 hrs  
298 evidenced by disintegration and dissolution tests followed by rapid disintegration in 20 minutes at  
299 pH 6.8. The NP size distribution was measured in dissolution medium showing that most of the NPs'  
300 sizes were about 200 nm and that a small part of them formed 5 µm aggregates (Fig. 3A).  
301 Furthermore, the antigen kept its integrity and immunogenicity as evidenced by SDS-PAGE analysis  
302 (Fig. 3B and 3C) and western blot analysis (Fig 3D) of NPs recovered from dissolution medium. Thus,  
303 an administrable oral form was obtained by freeze-drying and capsule filling of CS-*EgTrp*-MPLA-

304 NPs and CS-*EgA31*-MPLA-NPs and it can retain all its characteristics to ensure an efficient delivery  
 305 of vaccine antigens to the target region of the dog's intestine.

306  
 307  
 308

**Table 2.** Properties of CS-MPLA-NPs containing *EgTrp* and *EgA31*

Sample	Particle mean size (nm)	Polydispersity index	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
CS- <i>EgTrp</i> -MPLA-NPs	187.8 ± 39.6	0.105 ± 0.024	+28.8 ± 0.4	82.9 %
CS- <i>EgA31</i> -MPLA-NPs	197.8 ± 11.5	0.065 ± 0.016	+29.3 ± 0.6	79.0 %

309  
 310  
 311  
 312

### 313 3.3. Effect of chitosan coating on NPs transport through Caco-2 cells

314 The transport of NPs through intestinal epithelial cells was tracked using Caco-2 cell  
 315 monolayers and assessed by Nile red fluorescence tracking. Figure 4 shows the fluorescence of the  
 316 cells incubated with NR-MPLA-NPs and CS-NR-MPLA-NPs and illustrates the impact of chitosan  
 317 coating on NPs interaction with them. Without surface modification, NPs seemed to accumulate in  
 318 the intercellular region, with the red fluorescence mainly detected in extracellular spaces with limited  
 319 intracellular fluorescence (Fig. 4A). Conversely, a higher fluorescence was observed after a 2-hrs  
 320 incubation with CS-MPLA-NPs that localized in intercellular and intracellular regions (Fig 4B).  
 321 Electron microscopy performed after 24-hr incubation showed the presence of CS-MPLA-NPs  
 322 clusters attached to the cell membrane and in the cytoplasm (Fig 4C and D). These observations  
 323 indicate the intercellular transport of CS-MPLA-NPs across Caco-2 cells and the suitability of surface  
 324 modification for optimal antigen intestinal delivery.

325

### 326 3.4. Effect of surface modification on NP uptake by antigen presenting cells

327 The cytotoxicity of MPLA-NPs and CS-MPLA-NPs was evaluated on J774 macrophages after a 24-  
 328 hr incubation showing good tolerance of these formulations (more than 95% of viability) for all the  
 329 dilutions tested. Uptake experiments using NR-MPLA-NPs and CS-NR-MPLA-NPs showed that they  
 330 were rapidly internalized inside macrophages during the first hour of incubation with massive red

331 fluorescence observed inside the cells (supplementary S2). After 1 hr, red fluorescent spots started  
332 to be observed indicating that NPs localized inside lysosomes (supplementary S2). These  
333 observations were confirmed by confocal microscopy performed after the end of incubation (Fig. 5A  
334 and B). The remarkable red fluorescent spots observed inside macrophages for the two formulations  
335 were more numerous with CS-MPLA-NPs.

336 Similar observations were made with bone marrow-derived DCs (Fig. 5C and D), where  
337 internalization of NPs was increased after chitosan coating. These results suggest the compatibility  
338 of MPLA and CS and the effectiveness of using them together to increase NP internalization and  
339 hence antigen delivery to antigen presenting cells.

340

#### 341 **4. Discussion**

342 The aim of the present work was to develop a new delivery system for the two recombinant  
343 antigens *EgTrp* and *EgA31* that would ensure an oral vaccination of dogs against *Echinococcus*  
344 *granulosus*. In a previous pilot study, recombinant *EgTrp* and *EgA31* were used in vaccination trials  
345 using attenuated *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* as a delivery system and a high level of  
346 protection had been induced (Pétavy et al., 2008). However, the use and the administration of  
347 genetically modified bacteria could be a drawback for environmental considerations as well as for  
348 the development of infectious diseases (Karch & Burkhard, 2016). In this context, an alternative  
349 vaccine delivery system should meet the following criteria: (i) to ensure good encapsulation and  
350 protection of recombinant antigens, (ii) to enhance antigen delivery to antigen-presenting cells at the  
351 canine Peyer's patches level, (iii) to induce a significant stimulation inducing a strong immune  
352 response and counterbalancing tolerance and (iv) to be safe, biodegradable and easily administrable  
353 to dogs.

354 For this goal, polymeric-based nanoparticles have been selected since they are widely used for the  
355 development of new vaccines and particularly for oral vaccination and their advantage in antigen  
356 protection, antigen delivery and immune system stimulation has been well demonstrated, (Zhao et  
357 al., 2014). For this purpose, poly(D,L) lactic acid (PLA) was used to entrap the two recombinant  
358 antigens as this biodegradable polymer was previously used for antigen-loaded nanoparticles  
359 displaying interesting physicochemical properties for interaction with APCs (Tyler et al., 2016).

360 Monophosphoryl lipid A (MPLA) is a lipopolysaccharide derivative and a potent Toll-like receptor 4  
361 (TLR-4) ligand that has been approved in the European Community for HBV and HPV vaccines  
362 (Tritto et al., 2009). Its efficacy when included in polymeric nanoparticle system has been approved  
363 for in vitro and in vivo models and especially for mucosal and oral vaccination (Elamanchili et al.,  
364 2007; Sarti et al., 2011). Moreover, stimulation effects of MPLA in polymeric NPs were observed on  
365 canine macrophages by Guldner *et al.* (Guldner et al., 2016) and on canine dendritic cells, as  
366 demonstrated in our previous work even at low loading ratio (0.025% MPLA/PLA) (Milhau et al.,  
367 2020). For this study, we used our MPLA-NPs formulation to encapsulate *EgTrp* and *EgA31*. The  
368 MPLA was added at a 0.1% loading ratio in order to ensure a good stimulation for the *in vivo* study  
369 and this percentage could be reduced in accordance with our previous results (Milhau et al., 2020).  
370 Characterization of antigen-loaded NPs proved that this delivery system was able to efficiently  
371 encapsulate, conserve and protect these antigens. The obtained antigen-loaded NPs had a mean  
372 size about 200 nm considering that M cells internalize particles less than 1  $\mu\text{m}$ , as demonstrated for  
373 the uptake of PLGA-NP by murine Peyer's patches (Shakweh et al., 2005). The high encapsulation  
374 efficiency (around 85%) and antigen protection against gastric and intestinal conditions  
375 (supplementary S1) by nanoparticles evidence the suitability of this nanosystem for oral antigen  
376 delivery. The observed protective capacity against enzymatic degradation was in accordance with  
377 previously demonstrated results for insulin-loaded polymeric nanoparticle where polylactide-co-  
378 glycolide (PLGA) nanoparticles induced more than 60% of conserved insulin after similar incubation  
379 conditions (Jain et al., 2012).

380

381 The main goal of our developed nanoparticle-based vaccine was to ensure an efficient antigen  
382 delivery to mucosal immune cells present in the dog duodenum and jejunum where the pH is higher  
383 than 5.5 whatever the diet (Grayzel & Miller, 1928; HogenEsch & Felsburg, 1992). The delivery  
384 system should be pH sensitive and have enough mucoadhesivity in these target parts to be  
385 internalized by M cells and hence by APCs (des Rieux et al., 2006). The NPs' size and surface  
386 charge are important parameters in the design of such a system.

387 To increase the intestinal exposure time and mucodiffusion of our NP system, chitosan - a natural  
388 cationic polysaccharide obtained by chitin deacetylation widely applied for mucosal drug delivery

389 and vaccines (Xia et al., 2015) was selected to coat their surface. It is well known to increase the  
390 adhesion and permeability of nanoparticle delivery systems at the intestinal level, thus enhancing  
391 antigen delivery to APCs due to its positive charge and its ability to open the tight junctions at the  
392 epithelial intestinal barrier allowing paracellular transport (Sonaje et al., 2012). In this work, an  
393 optimized protocol was used to obtain positively charged CS-MPLA-NPs at a pH higher than 5.5 (Fig  
394 2A and B), promoting electrostatic interactions of CS-MPLA-NPs with the mucosa and hence their  
395 adhesion and retention on the dog intestinal epithelium. NP characterizations after chitosan coating  
396 confirmed the presence of a chitosan layer on their surface in accordance with the results obtained  
397 for chitosan-coated PLGA NPs designed for intranasal delivery regarding nanoparticle surface  
398 charge (Wang et al., 2013; Dou et al., 2019). Our protocol was successfully applied on *EgTrp* and  
399 *EgA31*-loaded MPLA-NPs without noticeable antigen alteration (Fig 2D and 2E).

400 To ensure efficient targeting to the dog duodenum and jejunum by antigen-loaded NPs, the pH  
401 sensitivity of the delivery system is an important feature. In addition, it has to be easy to administrate  
402 and stable during long storage. For these reasons, the developed NPs were freeze-dried and  
403 distributed into hard capsules to ensure a good storage and to facilitate oral administration to dogs.  
404 Eudragit® L100-55, an enteric coating material soluble above pH 5.5 was used to coat the capsules,  
405 thus enhancing the gastric protection of our system and allowing to focus their activity to the target  
406 region of the canine intestine where the pH is higher than 5.5. A similar approach for oral vaccination  
407 has been developed for a *H. pylori* recombinant antigen by including hydroxypropyl methylcellulose  
408 phthalate, a pH sensitive polymer, into PLGA-NPs and mice orally immunized with this formulation  
409 showed a significant protection (Tan et al., 2017). However, including a pH-sensitive polymer into  
410 the formulation of NPs was an interesting approach to protect the antigen from degradation, but had  
411 a limited efficacy for targeting a specific area of the intestine.

412 The compatibility of MPLA and chitosan was verified on NP internalization by J774 macrophages  
413 and Bone marrow-derived dendritic cells showing higher uptake profile in the case of CS-MPLA-NPs  
414 (Fig 5). Moreover, the interaction with the intestinal epithelium could be promoted, since *in vitro*, CS-  
415 MPLA-NPs preferentially accumulated in inter- and intracellular regions in Caco-2 cell monolayers  
416 compared to uncoated nanoparticles (Fig 4). Our observations are in accordance with the ones  
417 obtained with fluorescein isothiocyanate-labeled chitosan formulated into nanoparticles as reported

418 by Jia et al. (2009). They reported the transcellular transport of chitosan nanoparticles through Caco-  
419 2 monolayer which was initiated by electrostatic force between the positive charged nanoparticles  
420 and negatively charged cell membrane (Jia et al., 2009). Similar results were reported by Dou et al.  
421 (2019) for the chitosan-coated PLGA nanoparticle and their interaction with Caco-2 monolayers  
422 which showed that chitosan coating increases the particle attachment and then internalization by  
423 Caco-2 cells. These chitosan-coated PLGA nanoparticles showed a significantly improved cellular  
424 uptake and transcellular transport and therefore exhibited a better transcellular permeability of poor-  
425 soluble drugs. The enhancement of nanoparticle adhesion and retention at the mucosal epithelium  
426 by chitosan coating allowing better antigen delivery and hence the induction of mucosal immune  
427 response was highlighted by previous reports of nano-based mucosal vaccination. In the case of a  
428 Hepatitis B surface antigen-loaded PLGA-NPs, the intranasal administration induced higher level of  
429 serum IgG and secretory IgA for the chitosan-coated particles (Pawar et al., 2013). In addition, Cole  
430 et al. (2018) showed that ovalbumin-loaded chitosan nanoparticles had an enhanced permeability  
431 through Caco-2 monolayers triggering a higher mucosal IgA response following oral immunization  
432 of mice.

433 Our developed oral vaccine in the form of freeze-dried CS-*EgTrp* MPLA-NPs and CS-*EgA31*-MPLA-  
434 NPs, filled into enteric-coated capsules was used for a preliminary in vivo study carried out on a  
435 limited number of dogs and gave encouraging results (data not shown).

436 Oral vaccines against Echinococcosis and especially those based on nanoparticles as vectors are  
437 very scarce. In addition, the majority of dog vaccination trials used injectable formulations and oral  
438 vaccination trials have been carried out, but none have been conclusive so far. Gottstein et al.  
439 developed a vaccine using the *III/3-10* gene fragment from *Echinococcus multilocularis* coding for a  
440 species-specific antigen expressed in live attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain LT2  
441 M1C (Gottstein et al., 1990). Two vaccinated (subcutaneous and peroral) dogs showed a strong  
442 humoral immune response to *S. typhimurium* antigens and to the recombinant *E. multilocularis*  
443 antigen. Later Carol et al. (1998) demonstrated that nasal immunization using immunostimulating  
444 complexes made from a *E. granulosus* tegumental antigen from protoscoleces induced secretory  
445 IgA in the saliva and the serum of immunized dogs. In both reports, neither challenge infection was

446 carried out nor effect of the vaccination on the number of worms were described. Li et al. (2018)  
447 tested the EG14-3-3 antigen loaded into MPLA-liposomes on *Echinococcus*-infected mice and even  
448 if a systemic response with a high protective immunity was obtained after subcutaneously  
449 immunization, the work remains limited to mice. Zhang et al. (2006) studied the protective effect of  
450 3 injections of *EgM4*, *EgM9* and *EgM123* using Freund's adjuvant and their vaccine induced a high  
451 level of protective immunity against *E. granulosus* infection in dogs, especially in terms of  
452 suppression of worm growth and of egg development and embryogenesis. They later used Quil A  
453 and ISCOM as an adjuvant to confirm the vaccine efficacy of the *EgM* proteins (Zhang et al., 2018)  
454 and also observed a systemic response with IgG production. These experiments show that the use  
455 of adjuvants is not probably sufficient to change the immune response and the protective level.  
456 Kouguchi et al. (2013) reported mucosal vaccination experiments against *E. multilocularis*. Dogs  
457 were vaccinated using 500 µg of crude SRf1 antigens mixed with 1 cholera toxin (CT) subunit B  
458 administered nasally followed by 3 boosters of SRf1 administered orally. They observed a great  
459 reduction in the number of worms confirming the interest of mucosal immunization. Recently Vogt et  
460 al. (2018) developed a method for oral immunization displaying heterologous proteins on the surface  
461 of *B. subtilis* biofilms by introducing the coding sequences of *EgA31* and *EgTrp*. The application of  
462 the recombinant *B. subtilis* spores led to the colonization of the gut and the induction of specific IgG  
463 and IgA antibodies, but no challenge infection has been reported.  
464 In the present work we considered for the first time to use a nanovaccine for mucosal immunization.  
465 Surely, the vaccination of dogs could be effective for controlling Echinococcosis and we think that  
466 our system, is a promising one. As for the *EgA31* and *EgTrp* antigens, their protective effect have  
467 been shown and published previously (Fu et al., 1999; Fraize et al., 2005).

468

## 469 **5. Conclusion**

470 The successful encapsulation of the *E. granulosus* antigens and the definitive formulation of  
471 the described NPs allowed the successful activating effect on canine immunological cells. The  
472 addition of chitosan increased the internalization of nanoparticles and promoted their adhesion to  
473 the mucosa. A preliminary in vivo test on dogs gave a good protection rate and experiments will be  
474 performed in the future to confirm the protective effect of our vaccine.



475

#### 476 **Funding**

477 This work was financed by the European Union (project number: PARAVAC FP7-KBBE-2010-4).  
478 Uruguaysito Benavides, Imène Hellel-Bourtal and Cecilia Silvarrey were recipient of a grant from the  
479 same project. Marine Leroux was financed from our own funds.

480 The authors declare that the experiments were in accordance with the current laws of the countries  
481 in which the experiments were performed.

#### 482 **Conflict of interest**

483 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships  
484 that could have appeared to influence the work reported in this paper.

485

#### 486 **Figures Captions**

487 **Fig 1. Scanning electron microscopy observations and SDS page analysis of the prepared**  
488 **nanoparticles:** (A) Blank-MPLA-NPs, (B) *EgTrp*-MPLA-NPs and (C) *EgA31*-MPLA-NPs. The images  
489 show the spherical shape and homogenized size near to 200 nm for the three formulations. SDS  
490 page analysis after Coomassie Blue staining of *EgTrp* (D) and *EgA31* (E) extracted from the NPs.  
491 Lane 1: molecular weight markers, lane 2: antigen (positive control), lane 3: antigen treated with  
492 acetonitrile (control of the extraction step), lane 4: total antigen-loaded NP suspension after  
493 treatment with acetonitrile, lane 5: supernatant, lane 6: pellet of NPs after treatment with acetonitrile.

494 **Fig 2. Characterization of CS-MPLA-NPs.** (A) Zeta potential measurements of the CS-MPLA-NP  
495 suspension after incubation with various concentrations of chitosan for various time intervals, (B)  
496 Zeta potential measurements of CS-MPLA-NPs as function of the pH. NPs were previously  
497 incubated with 0,1% of chitosan for 4 hrs. (C) Transmission electron microscopy of CS-MPA-NPs.  
498 (D and E) Integrity of the encapsulated antigens before and after chitosan coating assessed by  
499 SDS page analysis compared to non-encapsulated antigens. (D) CS-*EgTrp*-MPLA-NP and (E)  
500 CS-*EgA31*-MPLA-NP. Lane 1: antigen, lane 2: antigen treated similarly to the NP extraction  
501 method, lane 3: antigen extracted from the whole NP suspension before chitosan treatment, lane

502 4: from the supernatant, lane 5: from the pellet, lane 6: the total after chitosan treatment, lane 7:  
503 the corresponding supernatant, lane 8: the corresponding pellet.

504 **Fig 3. Antigen loaded CS-MPLA-NPs characterization after freeze-drying and capsule filling.**

505 (A) Size distribution of CS-MPLA-NPs after freeze-drying and redispersion in water (green) and after  
506 capsule filling and dissolution in pH 6.8 (blue) compared to the CS-MPLA-NPs original suspension  
507 (red). (B and C) SDS page analysis of protein extracted from CS-MPLA-NPs loaded with *EgA31* (B)  
508 and *EgTrp* (C) after freeze-drying and capsule filling. Free antigens were used as controls (lane 1).  
509 Proteins were extracted from lyophilized NP (lane 2) or from the total suspension (lane 3), the  
510 supernatant (lane 4) and the pellet (lane 5) of capsule-filled NP after dissolution in intestinal medium.  
511 (D) Western blot analysis of *EgTrp* extracted from CS-MPLA-NPs before (lane 1) and after  
512 lyophilization (lane 2).

513 **Fig 4. Nanoparticles transport through Caco-2 cells.** Fluorescent microscopy images of Caco-

514 2 cells 2 hrs after incubation with NR-MPLA-NPs (A) and CS-NR-MPLA-NPs (B). Transmission  
515 electron microscopy of Caco-2 cells after 24 hrs incubation with CS-MPLA-NPs (C and D).

516 **Fig 5. Nanoparticles uptake by antigen presenting cells.** (A,B): Confocal microscopy images of

517 J774 macrophages after incubation for 2 hrs with NR-MPLA-NPs (A) and CS-NR-MPLA-NPs (B).

518 The samples were counterstained with the Hoechst 33342 fluorescent dye (blue). (C,D):

519 fluorescence microscopy images of DCs after incubation for 24 hrs with NR-MPLA-NPs (C) and

520 CS-NR-MPLA-NPs (D).

521

522 **References**

523

524 Carol H, Nieto A. A mucosal IgA response, but no systemic antibody response, is evoked by  
525 intranasal immunisation of dogs with *Echinococcus granulosus* surface antigens iscoms. *Vet*  
526 *Immunol Immunopathol.* 1998;65: 29–41. doi:10.1016/s0165-2427(98)00171-8

527 Cole H, Bryan D, Lancaster L, Mawas F, Vilasaliu D. Chitosan nanoparticle antigen uptake in  
528 epithelial monolayers can predict mucosal but not systemic in vivo immune response by oral  
529 delivery. *Carbohydr Polym.* 2018;190: 248–254. doi:10.1016/j.carbpol.2018.02.084

530 des Rieux A, Fievez V, Garinot M, Schneider Y-J, Pr at V. Nanoparticles as potential oral delivery  
531 systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. *J Controlled Release*. 2006;116: 1–27.  
532 doi:10.1016/j.jconrel.2006.08.013

533 Dou T, Wang J, Han C, Shao X, Zhang J, Lu W. Cellular uptake and transport characteristics of  
534 chitosan modified nanoparticles in Caco-2 cell monolayers. *Int J Biol Macromol*. 2019;138: 791–  
535 799. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.168

536 Echinococcosis fact sheet. [cited 23 May 2020]. Available: [https://www.who.int/news-room/fact-](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis)  
537 [sheets/detail/echinococcosis](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/echinococcosis)

538 Elamanchili P, Lutsiak CME, Hamdy S, Diwan M, Samuel J. “Pathogen-mimicking” nanoparticles  
539 for vaccine delivery to dendritic cells. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2007;30: 378–395.  
540 doi:10.1097/CJI.0b013e31802cf3e3

541 Esteves A, Se orale M, Ehrlich R. A tropomyosin gene is differentially expressed in the larval  
542 stage of *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Res*. 2003;89: 501–502. doi:10.1007/s00436-002-  
543 0791-4

544 Fraize M, Sarciron ME, Azzouz S, Issaadi N, Bosquet G, Petavy AF, et al. Immunogenicity of two  
545 *Echinococcus granulosus* antigens EgA31 and EgTrp in mice. *Parasitol Res*. 2005;96: 113–120.  
546 doi:10.1007/s00436-005-1322-x

547 Fu Y, Martinez C, Chalar C, Craig PS, Ehrlich R, Petavy A-F, et al. A new potent antigen from  
548 *Echinococcus granulosus* associated with muscles and tegument. *Mol Biochem Parasitol*.  
549 1999;102: 43–52. doi:10.1016/S0166-6851(99)00084-5

550 Fu Y, Saint-André Marchal I, Marchal T, Bosquet G, Petavy AF. Cellular immune response of  
551 lymph nodes from dogs following the intradermal injection of a recombinant antigen corresponding  
552 to a 66 kDa protein of *Echinococcus granulosus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 2000;74: 195–208.  
553 doi:10.1016/S0165-2427(00)00171-9

554 Gemmell MA. Natural and acquired immunity factors interfering with development during the rapid  
555 growth phase of *Echinococcus granulosus* in dogs. *Immunology*. 1962;5: 496–503.

556 Gottstein B, M ller N, Cryz SJ, Vogel M, Tanner I, Seebeck T. Humoral and cellular immune  
557 response in mice and dogs induced by a recombinant *Echinococcus multilocularis* antigen  
558 produced by a *Salmonella typhimurium* vaccine strain. *Parasite Immunol*. 1990;12: 163–174.  
559 doi:10.1111/j.1365-3024.1990.tb00945.x

560 Grayzel DM, Miller EG. The pH of the contents of the gastrointestinal tract in dogs, in relation to  
561 diet and rickets. *J Biol Chem*. 1928;76: 423–436.

562 Guldner D, Hwang JK, Cardieri MCD, Eren M, Ziaei P, Norton MG, et al. In Vitro Evaluation of the  
563 Biological Responses of Canine Macrophages Challenged with PLGA Nanoparticles Containing  
564 Monophosphoryl Lipid A. *PLoS ONE*. 2016;11. doi:10.1371/journal.pone.0165477

565 HogenEsch H, Felsburg PJ. Immunohistology of Peyer’s patches in the dog. *Vet Immunol*  
566 *Immunopathol*. 1992;30: 147–160. doi:10.1016/0165-2427(92)90135-D

567 Jain S, Rathi VV, Jain AK, Das M, Godugu C. Folate-decorated PLGA nanoparticles as a rationally  
568 designed vehicle for the oral delivery of insulin. *Nanomed*. 2012;7: 1311–1337.  
569 doi:10.2217/nnm.12.31

570 Jia X, Chen X, Xu Y, Han X, Xu Z. Tracing transport of chitosan nanoparticles and molecules in  
571 Caco-2 cells by fluorescent labeling. *Carbohydr Polym*. 2009;78: 323–329.  
572 doi:10.1016/j.carbpol.2009.04.020

573 Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein  
574 assemblies. *Biochem Pharmacol.* 2016;120: 1–14. doi:10.1016/j.bcp.2016.05.001

575 Kouguchi H, Matsumoto J, Nakao R, Yamano K, Oku Y, Yagi K. Characterization of a Surface  
576 Glycoprotein from *Echinococcus multilocularis* and Its Mucosal Vaccine Potential in Dogs. *PLOS*  
577 *ONE.* 2013;8: e69821. doi:10.1371/journal.pone.0069821

578 Li Z, Ding S, Li Y. Study on the immunity protection of 14-3-3-MPLA-liposome vaccine against  
579 cystic echinococcosis in mice. *Front Lab Med.* 2018;2: 146–151. doi:10.1016/j.flm.2019.05.002

580 Milhau N, Almouazen E, Bouteille S, Hellel-Bourtal I, Azzouz-Maache S, Benavides U, et al. In vitro  
581 evaluations on canine monocyte-derived dendritic cells of a nanoparticles delivery system for  
582 vaccine antigen against *Echinococcus granulosus*. *PLOS ONE.* 2020;15: e0229121.  
583 doi:10.1371/journal.pone.0229121

584 Movsesijan M, Sokolić A, Mladenović Z. Studies on the immunological potentiality of irradiated  
585 *Echinococcus granulosus* forms: immunization experiments in dogs. *Br Vet J.* 1968;124: 425–432.

586 Pawar D, Mangal S, Goswami R, Jaganathan KS. Development and characterization of surface  
587 modified PLGA nanoparticles for nasal vaccine delivery: Effect of mucoadhesive coating on  
588 antigen uptake and immune adjuvant activity. *Eur J Pharm Biopharm.* 2013;85: 550–559.  
589 doi:10.1016/j.ejpb.2013.06.017

590 Pétavy A-F, Hormaeche C, Lahmar S, Ouhelli H, Chabalgoity A, Marchal T, et al. An Oral  
591 Recombinant Vaccine in Dogs against *Echinococcus granulosus*, the Causative Agent of Human  
592 Hydatid Disease: A Pilot Study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008;2. doi:10.1371/journal.pntd.0000125

593 Pourseif MM, Moghaddam G, Saeedi N, Barzegari A, Dehghani J, Omid Y. Current status and  
594 future prospective of vaccine development against *Echinococcus granulosus*. *Biologicals.* 2018;51:  
595 1–11. doi:10.1016/j.biologicals.2017.10.003

596 Saboulard D, Lahmar S, Petavy A-F, Bosquet G. The *Echinococcus granulosus* antigen EgA31:  
597 localization during development and immunogenic properties. *Parasite Immunol.* 2003;25: 489–  
598 501. doi:10.1111/j.1365-3024.2003.00663.x

599 Sarti F, Perera G, Hintzen F, Kotti K, Karageorgiou V, Kammona O, et al. In vivo evidence of oral  
600 vaccination with PLGA nanoparticles containing the immunostimulant monophosphoryl lipid A.  
601 *Biomaterials.* 2011;32: 4052–4057. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.02.011

602 Shakweh M, Besnard M, Nicolas V, Fattal E. Poly (lactide-co-glycolide) particles of different  
603 physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice. *Eur J Pharm Biopharm.*  
604 2005;61: 1–13. doi:10.1016/j.ejpb.2005.04.006

605 Sonaje K, Chuang E-Y, Lin K-J, Yen T-C, Su F-Y, Tseng MT, et al. Opening of epithelial tight  
606 junctions and enhancement of paracellular permeation by chitosan: microscopic, ultrastructural,  
607 and computed-tomographic observations. *Mol Pharm.* 2012;9: 1271–1279. doi:10.1021/mp200572t

608 Tan Z, Liu W, Liu H, Li C, Zhang Y, Meng X, et al. Oral *Helicobacter pylori* vaccine-encapsulated  
609 acid-resistant HP55/PLGA nanoparticles promote immune protection. *Eur J Pharm Biopharm.*  
610 2017;111: 33–43. doi:10.1016/j.ejpb.2016.11.007

611 Thompson RCA, Jenkins DJ. *Echinococcus* as a model system: biology and epidemiology. *Int J*  
612 *Parasitol.* 2014;44: 865–877. doi:10.1016/j.ijpara.2014.07.005

613 Torgerson PR, Heath DD. Transmission dynamics and control options for *Echinococcus*  
614 *granulosus*. *Parasitology.* 2003;127 Suppl: S143-158.

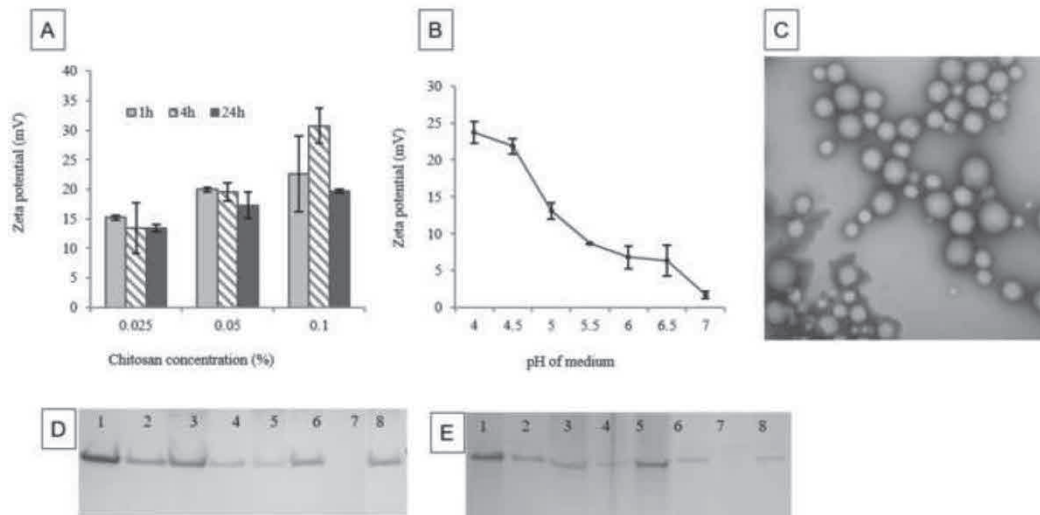
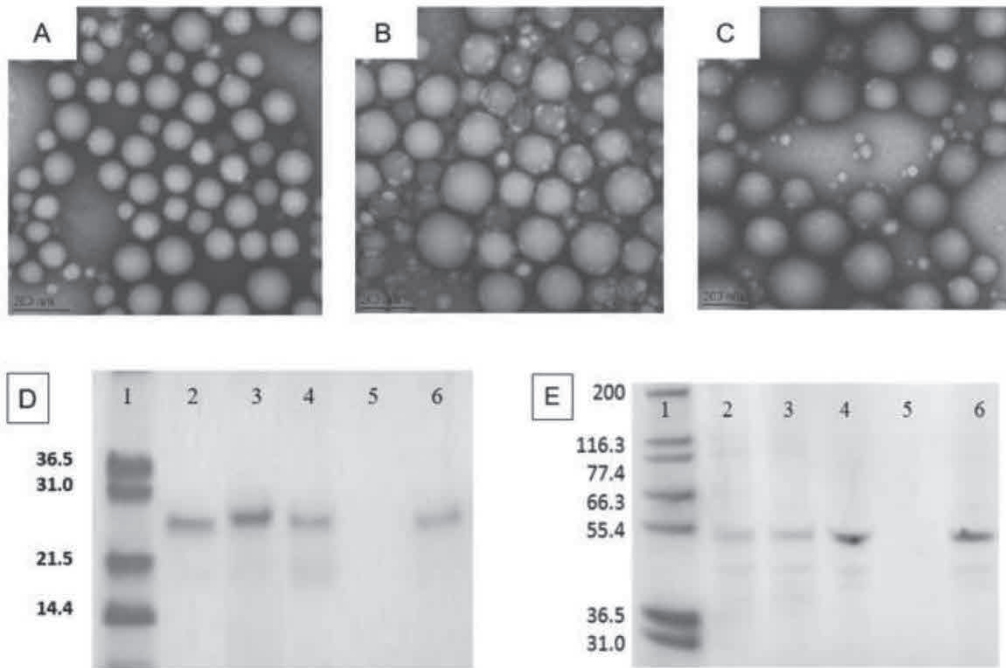
- 615 Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine*.  
616 2009;27: 3331–3334. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.084
- 617 Tyler B, Gullotti D, Mangraviti A, Utsuki T, Brem H. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers  
618 for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;107: 163–175.  
619 doi:10.1016/j.addr.2016.06.018
- 620 Vela Ramirez JE, Sharpe LA, Peppas NA. Current state and challenges in developing oral  
621 vaccines. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;114: 116–131. doi:10.1016/j.addr.2017.04.008
- 622 Vogt CM, Armúa-Fernández MT, Tobler K, Hilbe M, Aguilar C, Ackermann M, et al. Oral  
623 Application of Recombinant *Bacillus subtilis* Spores to Dogs Results in a Humoral Response  
624 against Specific *Echinococcus granulosus* Paramyosin and Tropomyosin Antigens. *Infect Immun*.  
625 2018;86. doi:10.1128/IAI.00495-17
- 626 Wang M, Zhang Y, Feng J, Gu T, Dong Q, Yang X, et al. Preparation, characterization, and in vitro  
627 and in vivo investigation of chitosan-coated poly (d,l-lactide-co-glycolide) nanoparticles for  
628 intestinal delivery of exendin-4. *Int J Nanomedicine*. 2013;8: 1141–1154. doi:10.2147/IJN.S41457
- 629 Xia Y, Fan Q, Hao D, Wu J, Ma G, Su Z. Chitosan-based mucosal adjuvants: Sunrise on the  
630 ocean. *Vaccine*. 2015;33: 5997–6010. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.101
- 631 Zhang W, Zhang Z, Shi B, Li J, You H, Tulson G, et al. Vaccination of dogs against *Echinococcus*  
632 *granulosus*, the cause of cystic hydatid disease in humans. *J Infect Dis*. 2006;194: 966–974.  
633 doi:10.1086/506622
- 634 Zhang Z-Z, Guo G, Li J, Shi B-X, Zhao L, Guo B-P, et al. Dog vaccination with EgM proteins  
635 against *Echinococcus granulosus*. *Infect Dis Poverty*. 2018;7: 61. doi:10.1186/s40249-018-0425-4
- 636 Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao C-X, Mitter N, Yu C, et al. Nanoparticle vaccines. *Vaccine*.  
637 2014;32: 327–337.

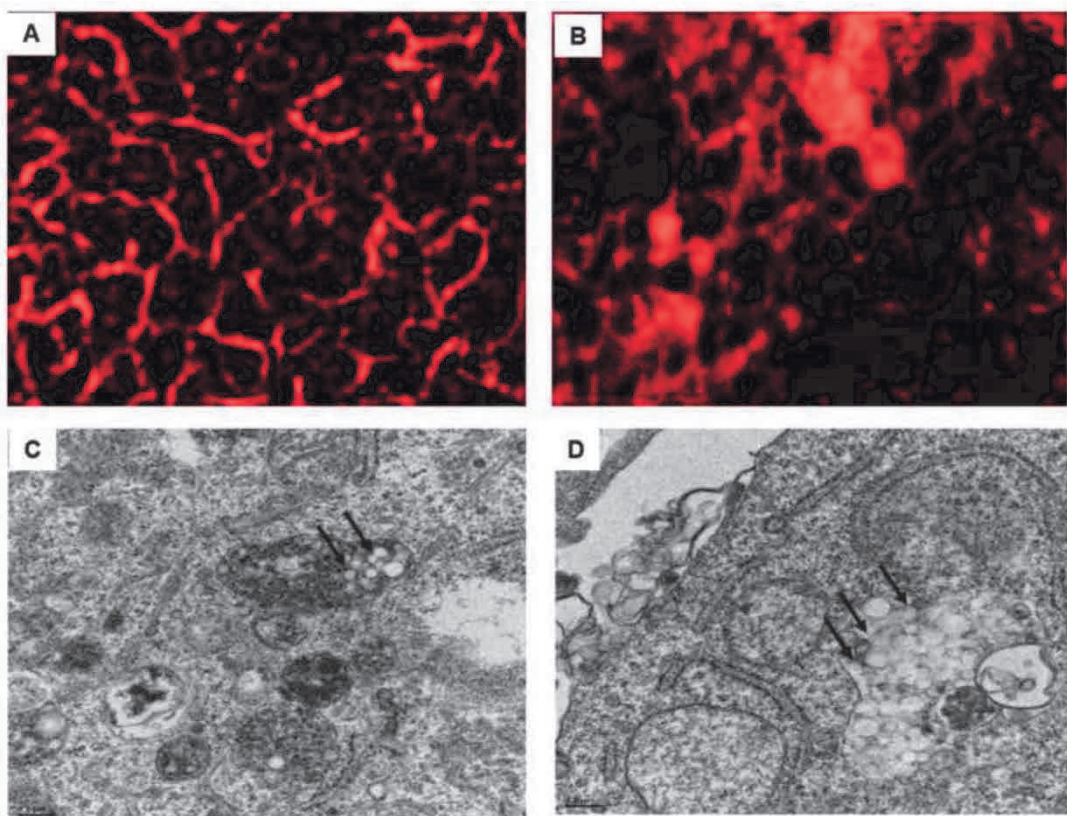
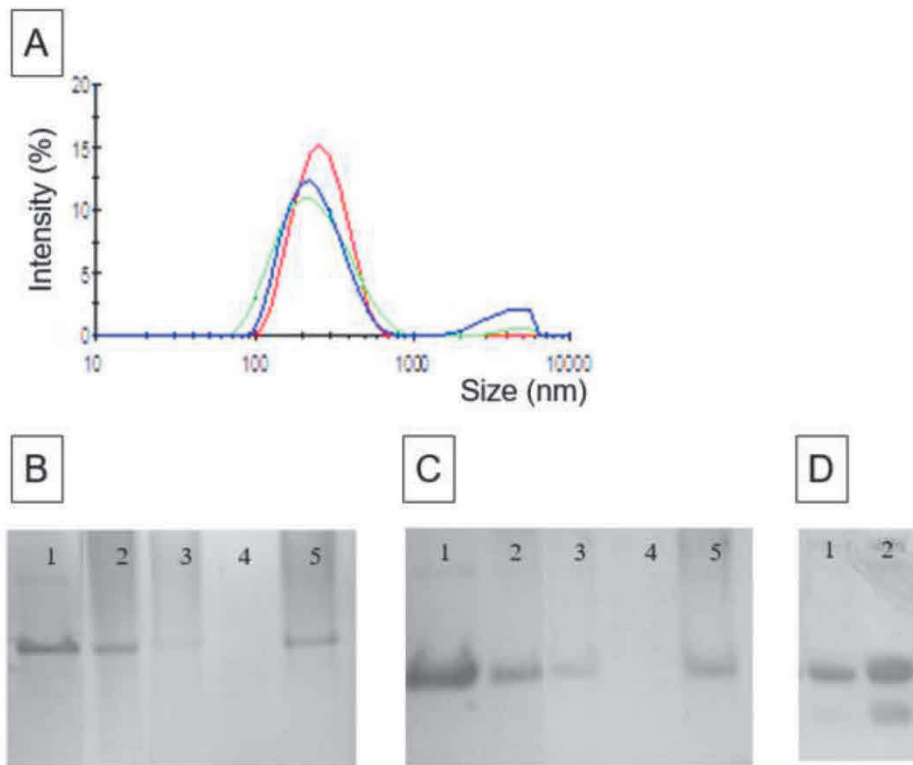
### 638 **Supporting information**

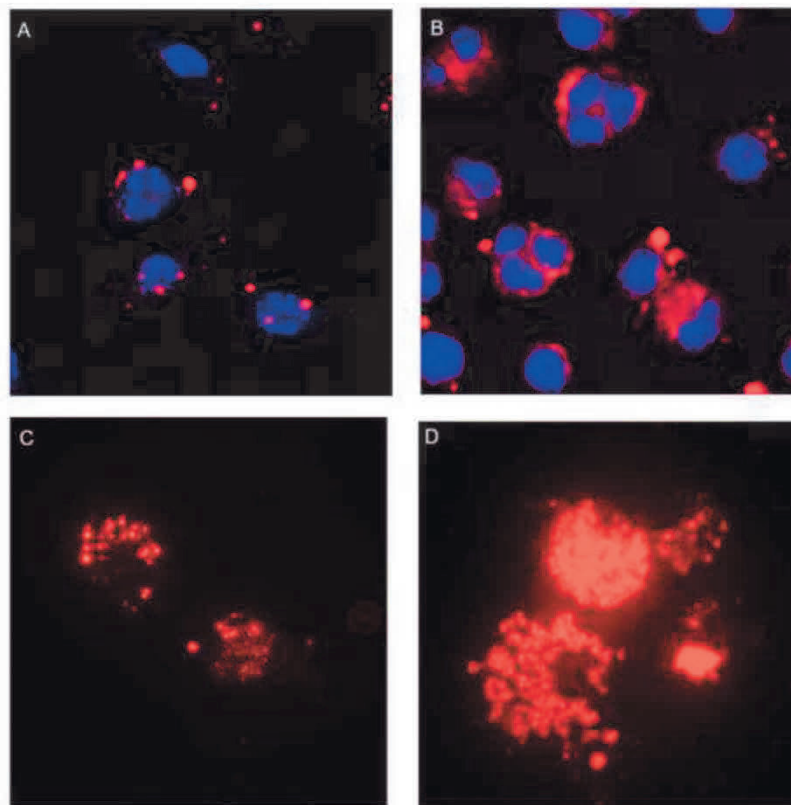
#### 639 **S1Fig. Protection of the *EgTrp*-NPs against gastric and intestinal degradation.**

640 A) SDS page analysis of *EgTrp* extracted from *EgTrp*-MPLA-NPs after incubation in water or buffer  
641 solution at pH 1.6 (simulating gastric conditions) for 2 and 6 hrs. (B) SDS page analysis of *EgTrp*  
642 extracted from *EgTrp*-MPLA-NPs after incubation in water or buffer solution at pH 6.8 (simulating  
643 intestinal conditions) for 2 and 6 hrs. (C) *EgTrp*-MPLA-NPs incubated for 2 hrs with artificial gastric  
644 fluid (SGF). NPs without treatment were used as control.

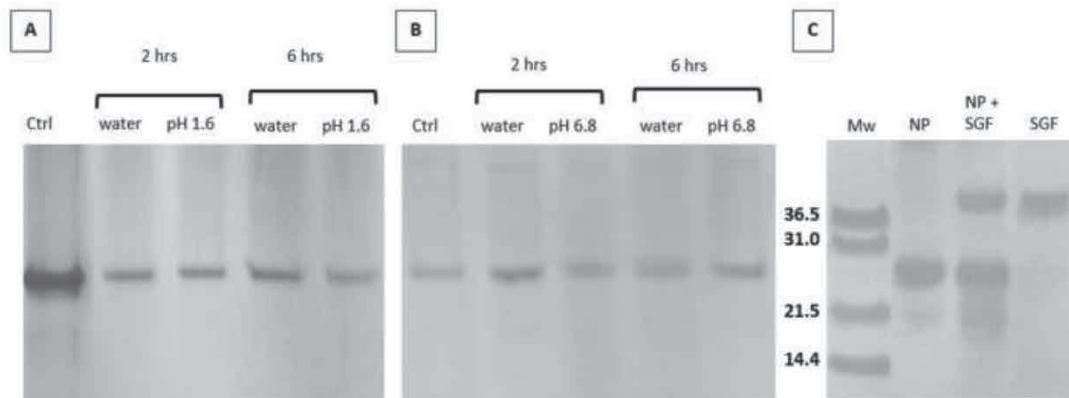
#### 645 **S2 Video. CS-NR-MPLA-NPs internalization by J774 macrophages during 2hrs of incubation** 646 **monitored by Nikon Biostation IM**







Figure





Multi-media supplement



## *Références bibliographiques*

- Adler, S., 1964. Leishmania, in: Dawes, B. (Ed.), *Advances in Parasitology*, *Advances in Parasitology*. Academic Press, pp. 35–96. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60586-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60586-2)
- Afonso, L., Borges, V.M., Cruz, H., Ribeiro-Gomes, F.L., DosReis, G.A., Dutra, A.N., Clarêncio, J., de Oliveira, C.I., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I., 2008. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Leukoc. Biol.* 84, 389–396. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108018>
- Akgoc, Z., Sena-Esteves, M., Martin, D.R., Han, X., d’Azzo, A., Seyfried, T.N., 2015. Bis(monoacylglycero)phosphate: a secondary storage lipid in the gangliosidoses. *J. Lipid Res.* 56, 1006–1013. <https://doi.org/10.1194/jlr.M057851>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., Sereno, D., 2016. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Aloulou, A., Rahier, R., Arhab, Y., Noiriél, A., Abousalham, A., 2018. Phospholipases: An Overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 1835, 69–105. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3)
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team, 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 7, e35671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Amidon, B., Brown, A., Waite, M., 1996. Transacylase and phospholipases in the synthesis of bis(monoacylglycero)phosphate. *Biochemistry* 35, 13995–14002. <https://doi.org/10.1021/bi961164o>
- Amidon, B., Schmitt, J.D., Thuren, T., King, L., Waite, M., 1995. Biosynthetic conversion of phosphatidylglycerol to sn-1:sn-1’ bis(monoacylglycerol) phosphate in a macrophage-like cell line. *Biochemistry* 34, 5554–5560. <https://doi.org/10.1021/bi00016a029>
- Andreou, A., Feussner, I., 2009. Lipoxygenases – Structure and reaction mechanism. *Phytochemistry, Jasmonates in Stress Responses and Development* 70, 1504–1510. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.008>
- Antoine, J.C., Prina, E., Jouanne, C., Bongrand, P., 1990. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect. Immun.* 58, 779–787. <https://doi.org/10.1128/iai.58.3.779-787.1990>
- Antoine, J.C., Prina, E., Lang, T., Courret, N., 1998. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends Microbiol.* 6, 392–401. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(98\)01324-9](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(98)01324-9)

Aoun, K., Bouratbine, A., 2014. Cutaneous Leishmaniasis in North Africa: a review. *Parasite* 21. <https://doi.org/10.1051/parasite/2014014>

Aoun, K., Bouratbine, A., Harrat, Z., Belkaïd, M., Bel Hadj Ali, S., 2001. [Particular profile of the zymodemes of *Leishmania infantum* causing visceral leishmaniasis in Tunisia]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1990 94, 375–377.

Aoun, K., Bouratbine, A., Harrat, Z., Guizani, I., Mokni, M., Bel Hadj Ali, S., Ben Osman, A., Belkaïd, M., Dellagi, K., Ben Ismaïl, R., 2000. [Epidemiologic and parasitologic data concerning sporadic cutaneous leishmaniasis in northern Tunisia]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1990 93, 101–103.

Aquino, G.P. de, Gomes, M.A.M., Salinas, R.K., Laranjeira-Silva, M.F., 2021. Lipid and fatty acid metabolism in trypanosomatids. *Microb. Cell* 8, 262–275. <https://doi.org/10.15698/mic2021.11.764>

Araújo-Santos, T., Rodríguez, N.E., Moura-Pontes, S., Dixt, U.G., Abánades, D.R., Bozza, P.T., Wilson, M.E., Borges, V.M., 2014. Role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  production in lipid bodies from *Leishmania infantum* chagasi: insights on virulence. *J. Infect. Dis.* 210, 1951–1961. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu299>

Arcanjo, A.F., Nunes, M.P., Silva-Junior, E.B., Leandro, M., da Rocha, J.D.B., Morrot, A., Decote-Ricardo, D., Freire-de-Lima, C.G., 2017. B-1 cells modulate the murine macrophage response to *Leishmania major* infection. *World J. Biol. Chem.* 8, 151–162. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v8.i2.151>

Arnal-Levron, M., Chen, Y., Greimel, P., Calevro, F., Gaget, K., Riols, F., Batut, A., Bertrand-Michel, J., Hullin-Matsuda, F., Olkkonen, V.M., Delton, I., Luquain-Costaz, C., 2019. Bis(monoacylglycerol)phosphate regulates oxysterol binding protein-related protein 11 dependent sterol trafficking. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864, 1247–1257. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.05.011>

Authi, K.S., Lagarde, M., Crawford, N., 1985. Diacylglycerol lipase activity in human platelet intracellular and surface membranes. *FEBS Lett.* 180, 95–101. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(85\)80239-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(85)80239-8)

Azzouz, S., Maache, M., Dos Santos, M.F., Sarciron, M.E., Petavy, A.F., Osuna, A., 2006. Aspects of the cytological activity of edelfosine, miltefosine, and ilmofosine in *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* 92, 877–883. <https://doi.org/10.1645/GE-632R1.1>

Azzouz, S., Maache, M., Sánchez-Moreno, M., Petavy, A.F., Osuna, A., 2007. Effect of alkyllysophospholipids on some aspects of the metabolism of *Leishmania donovani*. *J. Parasitol.* 93, 1202–1207.

Bailey, M.S., Lockwood, D.N.J., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 25, 203–211. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.05.008>

- Bennett, M., Gilroy, D.W., 2016. Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016>
- Ben-Othman, R., Flannery, A.R., Miguel, D.C., Ward, D.M., Kaplan, J., Andrews, N.W., 2014. Leishmania-mediated inhibition of iron export promotes parasite replication in macrophages. *PLoS Pathog.* 10, e1003901. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003901>
- Besson, N., Hullin-Matsuda, F., Makino, A., Murate, M., Lagarde, M., Pageaux, J.-F., Kobayashi, T., Delton-Vandenbroucke, I., 2006. Selective incorporation of docosahexaenoic acid into lysobisphosphatidic acid in cultured THP-1 macrophages. *Lipids* 41, 189–196. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-5087-5>
- Bhattacharjee, A., Majumder, S., Das, S., Ghosh, S., Biswas, S., Majumdar, S., 2016. Leishmania donovani-Induced Prostaglandin E2 Generation Is Critically Dependent on Host Toll-Like Receptor 2–Cytosolic Phospholipase A2 Signaling. *Infect. Immun.* 84, 2963–2973. <https://doi.org/10.1128/IAI.00528-16>
- Boelaert, M., El-Safi, S., Hailu, A., Mukhtar, M., Rijal, S., Sundar, S., Wasunna, M., Aseffa, A., Mbui, J., Menten, J., Desjeux, P., Peeling, R.W., 2008. Diagnostic tests for kala-azar: a multi-centre study of the freeze-dried DAT, rK39 strip test and KAtex in East Africa and the Indian subcontinent. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 32–40. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.09.003>
- Bouazizi-Ben Messaoud, H., Guichard, M., Lawton, P., Delton, I., Azzouz-Maache, S., 2017. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of Leishmania donovani Complex Promastigotes into Amastigotes. *Lipids* 52, 433–441. <https://doi.org/10.1007/s11745-017-4233-6>
- Bouvier, J., Zemski Berry, K.A., Hullin-Matsuda, F., Makino, A., Michaud, S., Geloën, A., Murphy, R.C., Kobayashi, T., Lagarde, M., Delton-Vandenbroucke, I., 2009. Selective decrease of bis(monoacylglycero)phosphate content in macrophages by high supplementation with docosahexaenoic acid. *J. Lipid Res.* 50, 243–255. <https://doi.org/10.1194/jlr.M800300-JLR200>
- Brannigan, J.A., Smith, B.A., Yu, Z., Brzozowski, A.M., Hodgkinson, M.R., Maroof, A., Price, H.P., Meier, F., Leatherbarrow, R.J., Tate, E.W., Smith, D.F., Wilkinson, A.J., 2010. N-myristoyltransferase from Leishmania donovani: structural and functional characterisation of a potential drug target for visceral leishmaniasis. *J. Mol. Biol.* 396, 985–999. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.12.032>
- Bray, R.S., 1974. Leishmania. *Annu. Rev. Microbiol.* 28, 189–217. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.28.100174.001201>
- Breiden, B., Sandhoff, K., 2021. Acid Sphingomyelinase, a Lysosomal and Secretory Phospholipase C, Is Key for Cellular Phospholipid Catabolism. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9001. <https://doi.org/10.3390/ijms22169001>

- Brittingham, A., Chen, G., McGwire, B.S., Chang, K.P., Mosser, D.M., 1999. Interaction of *Leishmania* gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect. Immun.* 67, 4477–4484. <https://doi.org/10.1128/IAI.67.9.4477-4484.1999>
- Brotherus, J., Renkonen, O., Herrmann, J., Fischer, W., 1974. Novel stereoconfiguration in lyso-bis-phosphatidic acid of cultured BHK-cells. *Chem. Phys. Lipids* 13, 178–182. [https://doi.org/10.1016/0009-3084\(74\)90034-6](https://doi.org/10.1016/0009-3084(74)90034-6)
- Burdge, G.C., Calder, P.C., 2005. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod. Nutr. Dev.* 45, 581–597. <https://doi.org/10.1051/rnd:2005047>
- Burza, S., Croft, S.L., Boelaert, M., 2018. Leishmaniasis. *Lancet Lond. Engl.* 392, 951–970. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)
- Cameron, P., McGachy, A., Anderson, M., Paul, A., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Alexander, J., Plevin, R., 2004. Inhibition of lipopolysaccharide-induced macrophage IL-12 production by *Leishmania mexicana* amastigotes: the role of cysteine peptidases and the NF-kappaB signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md* 173, 3297–3304. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.5.3297>
- Carneiro, P.P., Conceição, J., Macedo, M., Magalhães, V., Carvalho, E.M., Bacellar, O., 2016. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148084>
- Carnielli, J.B.T., Crouch, K., Forrester, S., Silva, V.C., Carvalho, S.F.G., Damasceno, J.D., Brown, E., Dickens, N.J., Costa, D.L., Costa, C.H.N., Dietze, R., Jeffares, D.C., Mottram, J.C., 2018. A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis. *EBioMedicine* 36, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.09.029>
- Carpio, L.E., Villalaín, J., 2020. Identification of the phospholipid binding regions of the envelope E protein of flaviviruses by molecular dynamics. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 38, 5136–5147. <https://doi.org/10.1080/07391102.2019.1697368>
- Carrière, F., Longhi, S., Record, M., 2020. The endosomal lipid bis(monoacylglycero) phosphate as a potential key player in the mechanism of action of chloroquine against SARS-COV-2 and other enveloped viruses hijacking the endocytic pathway. *Biochimie* 179, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.05.013>
- Carter, C.R., Whitcomb, J.P., Campbell, J.A., Mukbel, R.M., McDowell, M.A., 2009. Complement Receptor 3 Deficiency Influences Lesion Progression during *Leishmania major* Infection in BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 77, 5668–5675. <https://doi.org/10.1128/IAI.00802-08>

- Carvalho, M.D.T., Alonso, D.P., Vendrame, C.M.V., Costa, D.L., Costa, C.H.N., Werneck, G.L., Ribolla, P.E.M., Goto, H., 2014. Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral leishmaniasis by *Leishmania infantum*. *Mediators Inflamm.* 2014, 230129. <https://doi.org/10.1155/2014/230129>
- Castellano, L.R., Filho, D.C., Argiro, L., Dessein, H., Prata, A., Dessein, A., Rodrigues, V., 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. *Hum. Immunol.* 70, 383–390. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.007>
- Castro, R., Scott, K., Jordan, T., Evans, B., Craig, J., Peters, E.L., Swier, K., 2006. THE ULTRASTRUCTURE OF THE PARASITOPHOUS VACUOLE FORMED BY *LEISHMANIA MAJOR*. *J. Parasitol.* 92, 1162–1170. <https://doi.org/10.1645/GE-841R.1>
- Ceccarelli, M., Diotallevi, A., Andreoni, F., Vitale, F., Galluzzi, L., Magnani, M., 2018. Exploiting genetic polymorphisms in metabolic enzymes for rapid screening of *Leishmania infantum* genotypes. *Parasit. Vectors* 11, 572. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3143-7>
- Chadwick, S., Kriegel, C., Amiji, M., 2010. Nanotechnology solutions for mucosal immunization. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 394–407. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.012>
- Chakravorty, D., Hansen-Wester, I., Hensel, M., 2002. Salmonella pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular Salmonella from reactive nitrogen intermediates. *J. Exp. Med.* 195, 1155–1166. <https://doi.org/10.1084/jem.20011547>
- Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L., 2002. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 13926–13931. <https://doi.org/10.1073/pnas.162468699>
- Chapkin, R.S., Seo, J., McMurray, D.N., Lupton, J.R., 2008. Mechanisms by which docosahexaenoic acid and related fatty acids reduce colon cancer risk and inflammatory disorders of the intestine. *Chem. Phys. Lipids* 153, 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.011>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R.W., Alvar, J., Boelaert, M., 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chawengsub, Y., Gauthier, K.M., Campbell, W.B., 2009. Role of arachidonic acid lipoxigenase metabolites in the regulation of vascular tone. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 297, H495–H507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00349.2009>

- Chawla, M., Vishwakarma, R.A., 2003. Alkylacylglycerolipid domain of GPI molecules of *Leishmania* is responsible for inhibition of PKC-mediated c-fos expression. *J. Lipid Res.* 44, 594–600. <https://doi.org/10.1194/jlr.M200296-JLR200>
- Chevallier, J., Chamoun, Z., Jiang, G., Prestwich, G., Sakai, N., Matile, S., Parton, R.G., Gruenberg, J., 2008. Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels. *J. Biol. Chem.* 283, 27871–27880. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801463200>
- Choudhary, V., Uaratanawong, R., Patel, R.R., Patel, H., Bao, W., Hartney, B., Cohen, E., Chen, X., Zhong, Q., Isales, C.M., Bollag, W.B., 2019. Phosphatidylglycerol Inhibits Toll-Like Receptor–Mediated Inflammation by Danger-Associated Molecular Patterns. *J. Invest. Dermatol.* 139, 868–877. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.10.021>
- Christie, W.W., Harwood, J.L., 2020. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators. *Essays Biochem.* 64, 401–421. <https://doi.org/10.1042/EBC20190082>
- Chu, Z., Witte, D.P., Qi, X., 2005. Saposin C-LBPA interaction in late-endosomes/lysosomes. *Exp. Cell Res.* 303, 300–307. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2004.09.029>
- Ciesielska, A., Sas-Nowosielska, H., Kwiatkowska, K., 2017. Bis(monoacylglycero)phosphate inhibits TLR4-dependent RANTES production in macrophages. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 83, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.12.003>
- Cochran, F.R., Roddick, V.L., Connor, J.R., Thornburg, J.T., Waite, M., 1987. Regulation of arachidonic acid metabolism in resident and BCG-activated alveolar macrophages: role of lyso(bis)phosphatidic acid. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 138, 1877–1883.
- Colas, R.A., Ashton, A.W., Mukherjee, S., Dalli, J., Akide-Ndunge, O.B., Huang, H., Desruisseaux, M.S., Guan, F., Jelicks, L.A., Matos dos Santos, F., Nagajyothi, J., Zingman, M.A., Reyes, J., Weiss, L.M., Serhan, C.N., Tanowitz, H.B., 2018. *Trypanosoma cruzi* Produces the Specialized Proresolving Mediators Resolvin D1, Resolvin D5, and Resolvin E2. *Infect. Immun.* 86. <https://doi.org/10.1128/IAI.00688-17>
- Convit, J., Ulrich, M., Zerpa, O., Borges, R., Aranzazu, N., Valera, M., Villarroel, H., Zapata, Z., Tomedes, I., 2003. Immunotherapy of american cutaneous leishmaniasis in Venezuela during the period 1990-99. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97, 469–472. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(03\)90093-9](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(03)90093-9)
- Courret, N., Fréhel, C., Gouhier, N., Pouchelet, M., Prina, E., Roux, P., Antoine, J.-C., 2002. Biogenesis of *Leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. Cell Sci.* 115, 2303–2316. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.11.2303>
- Covarrubias, A., Byles, V., Horng, T., 2013. ROS sets the stage for macrophage differentiation. *Cell Res.* 23, 984–985. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.88>



- Daro, E., Sheff, D., Gomez, M., Kreis, T., Mellman, I., 1997. Inhibition of endosome function in CHO cells bearing a temperature-sensitive defect in the coatamer (COPI) component epsilon-COP. *J. Cell Biol.* 139, 1747–1759. <https://doi.org/10.1083/jcb.139.7.1747>
- Das, N.K., 2020. Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis. *Indian J. Dermatol.* 65, 450–451. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_439\\_20](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_439_20)
- Davies, C.R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R., Rodriguez, N., 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saude Publica* 16, 925–950. <https://doi.org/10.1590/s0102-311x2000000400013>
- de Carvalho, C.C.C.R., Caramujo, M.J., 2018. The Various Roles of Fatty Acids. *Mol. J. Synth. Chem. Nat. Prod. Chem.* 23, 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- de Souza, W., Rodrigues, J.C.F., 2009. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs [WWW Document]. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.1155/2009/642502>
- Delton-Vandenbroucke, I., Bouvier, J., Makino, A., Besson, N., Pageaux, J.-F., Lagarde, M., Kobayashi, T., 2007. Anti-bis(monoacylglycerol)phosphate antibody accumulates acetylated LDL-derived cholesterol in cultured macrophages. *J. Lipid Res.* 48, 543–552. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600266-JLR200>
- Deng, B., Wang, C.-W., Arnardottir, H.H., Li, Y., Cheng, C.-Y.C., Dalli, J., Serhan, C.N., 2014. Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PloS One* 9, e102362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102362>
- Dinesh, N., Neelagiri, S., Kumar, V., Singh, S., 2017. Glycyrrhizic acid attenuates growth of *Leishmania donovani* by depleting ergosterol levels. *Exp. Parasitol.* 176, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.015>
- Dixon, H., Ginger, C.D., Williamson, J., 1971. The lipid metabolism of blood and culture forms of *Trypanosoma lewisi* and *Trypanosoma rhodesiense*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 39, 247–266. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90168-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90168-4)
- Duclos, S., Diez, R., Garin, J., Papadopoulou, B., Descoteaux, A., Stenmark, H., Desjardins, M., 2000. Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19, 3531–3541.
- Elamanchili, P., Diwan, M., Cao, M., Samuel, J., 2004. Characterization of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) based nanoparticulate system for enhanced delivery of antigens to dendritic cells. *Vaccine* 22, 2406–2412. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.032>

- Falguières, T., Luyet, P.-P., Bissig, C., Scott, C.C., Velluz, M.-C., Gruenberg, J., 2008. In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by Alix and Tsg101. *Mol. Biol. Cell* 19, 4942–4955. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0239>
- Falguières, T., Luyet, P.-P., Gruenberg, J., 2009. Molecular assemblies and membrane domains in multivesicular endosome dynamics. *Exp. Cell Res.* 315, 1567–1573. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.12.006>
- Faucher, B., Piarroux, R., 2011. Actualités sur les leishmanioses viscérales. *Rev. Médecine Interne* 32, 544–551. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2010.08.002>
- Field, M.C., Carrington, M., 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 775–786. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2221>
- Flegontov, P., Votýpka, J., Skalický, T., Logacheva, M.D., Penin, A.A., Tanifuji, G., Onodera, N.T., Kondrashov, A.S., Volf, P., Archibald, J.M., Lukeš, J., 2013. Paratrypanosoma is a novel early-branching trypanosomatid. *Curr. Biol. CB* 23, 1787–1793. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.07.045>
- Forestier, C.-L., Machu, C., Loussert, C., Pescher, P., Späth, G.F., 2011. Imaging Host Cell-Leishmania Interaction Dynamics Implicates Parasite Motility, Lysosome Recruitment, and Host Cell Wounding in the Infection Process. *Cell Host Microbe* 9, 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.03.011>
- Frank, C., Hadziandoniou, M., Pralong, F., Garifallou, A., Rioux, J.A., 1993. Leishmania tropica and Leishmania infantum responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 87, 184–185. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(93\)90482-6](https://doi.org/10.1016/0035-9203(93)90482-6)
- Gallo, P., Gonçalves, R., Mosser, D.M., 2010. The influence of IgG Density and Macrophage Fc (gamma) Receptor Cross-linking on Phagocytosis and IL-10 Production. *Immunol. Lett.* 133, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2010.07.004>
- Gawrisch, K., Soubias, O., 2008. Structure and dynamics of polyunsaturated hydrocarbon chains in lipid bilayers-significance for GPCR function. *Chem. Phys. Lipids* 153, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.02.016>
- Ghosh, J., Das, S., Guha, R., Ghosh, D., Naskar, K., Das, A., Roy, S., 2012. Hyperlipidemia offers protection against Leishmania donovani infection: role of membrane cholesterol. *J. Lipid Res.* 53, 2560–2572. <https://doi.org/10.1194/jlr.M026914>
- Ghosh, M., Roy, K., Das Mukherjee, D., Chakrabarti, G., Roy Choudhury, K., Roy, S., 2014. Leishmania donovani Infection Enhances Lateral Mobility of Macrophage Membrane Protein Which Is Reversed by Liposomal Cholesterol. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3367. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003367>

- Glomset, J.A., 2006. Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* 2006, pe6. <https://doi.org/10.1126/stke.3212006pe6>
- Goldszmid, R.S., Coppens, I., Lev, A., Caspar, P., Mellman, I., Sher, A., 2009. Host ER-parasitophorous vacuole interaction provides a route of entry for antigen cross-presentation in *Toxoplasma gondii*-infected dendritic cells. *J. Exp. Med.* 206, 399–410. <https://doi.org/10.1084/jem.20082108>
- Goto, H., Lauletta Lindoso, J.A., 2012. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26, 293–307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>
- Grabner, G.F., Fawzy, N., Schreiber, R., Pusch, L.M., Bulfon, D., Koefeler, H., Eichmann, T.O., Lass, A., Schweiger, M., Marsche, G., Schoiswohl, G., Taschler, U., Zimmermann, R., 2020. Metabolic regulation of the lysosomal cofactor bis(monoacylglycero)phosphate in mice. *J. Lipid Res.* 61, 995–1003. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA119000516>
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Troiani, M., 1992. HIV-Leishmania co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86, 161–163. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90551-m](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90551-m)
- Gruenberg, J., 2020. Life in the lumen: The multivesicular endosome. *Traffic Cph. Den.* 21, 76–93. <https://doi.org/10.1111/tra.12715>
- Guesnet, P., Alessandri, J.-M., Astorg, P., Pifferi, F., Lavialle, M., 2005. Les rôles physiologiques majeurs exercés par les acides gras polyinsaturés (AGPI). *Ol. Corps Gras Lipides* 12, 333–343. <https://doi.org/10.1051/ocl.2005.0333>
- Guillou, H., Zadavec, D., Martin, P.G.P., Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49, 186–199. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.12.002>
- Guimarães, E.T., Santos, L.A., Ribeiro dos Santos, R., Teixeira, M.M., dos Santos, W.L.C., Soares, M.B.P., 2006. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. *Microbes Infect.* 8, 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.11.011>
- Hammond, V.J., O'Donnell, V.B., 2012. Esterified eicosanoids: generation, characterization and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 2403–2412. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.12.013>
- Handman, E., Bullen, D.V.R., 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 18, 332–334. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)02352-8](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)02352-8)
- Helgadóttir, H., Ólafsson, Í., Andersen, K., Gizurarson, S., 2019. Stability of thromboxane in blood samples. *Vasc. Health Risk Manag.* 15, 143–147. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S204925>

Hendrickx, S., Bockstal, L.V., Caljon, G., Maes, L., 2019. In-depth comparison of cell-based methodological approaches to determine drug susceptibility of visceral *Leishmania* isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007885. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007885>

Hernández-Rivera, M.P., Ramírez-Ramírez, A., Chiñas-Pérez, A., Monroy-Ostria, A., Cancino-Díaz, M.E., Hernández-Montes, O., 2016. NRAMP1 Polymorphisms like Susceptibility Marker in Mexican Focus of Cutaneous Leishmaniasis. *BioMed Res. Int.* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7951285>

Hilley, J.D., Zawadzki, J.L., McConville, M.J., Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2000. *Leishmania mexicana* Mutants Lacking Glycosylphosphatidylinositol (GPI):Protein Transamidase Provide Insights into the Biosynthesis and Functions of GPI-anchored Proteins. *Mol. Biol. Cell* 11, 1183–1195.

Holzmuller, P., Geiger, A., Nzoumbou-Boko, R., Pissarra, J., Hamrouni, S., Rodrigues, V., Dauchy, F.-A., Lemesre, J.-L., Vincendeau, P., Bras-Gonçalves, R., 2018. Trypanosomatid Infections: How Do Parasites and Their Excreted–Secreted Factors Modulate the Inducible Metabolism of l-Arginine in Macrophages? *Front. Immunol.* 9, 778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00778>

Hullin-Matsuda, F., Kawasaki, K., Delton-Vandenbroucke, I., Xu, Y., Nishijima, M., Lagarde, M., Schlame, M., Kobayashi, T., 2007. De novo biosynthesis of the late endosome lipid, bis(monoacylglycero)phosphate. *J. Lipid Res.* 48, 1997–2008. <https://doi.org/10.1194/jlr.M700154-JLR200>

Hullin-Matsuda, F., Taguchi, T., Greimel, P., Kobayashi, T., 2014. Lipid compartmentalization in the endosome system. *Semin. Cell Dev. Biol.* 31, 48–56. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.04.010>

Hunsawong, T., Sunintaboon, P., Warit, S., Thaisomboonsuk, B., Jarman, R.G., Yoon, I.-K., Ubol, S., Fernandez, S., 2015. A novel dengue virus serotype-2 nanovaccine induces robust humoral and cell-mediated immunity in mice. *Vaccine* 33, 1702–1710. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.02.016>

Hurley, J.H., 2008. ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 20, 4–11. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.12.002>

Ilg, T., 2000. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol. Today Pers.* Ed 16, 489–497. [https://doi.org/10.1016/s0169-4758\(00\)01791-9](https://doi.org/10.1016/s0169-4758(00)01791-9)

Ilnytska, O., Lai, K., Gorshkov, K., Schultz, M.L., Tran, B.N., Jeziorek, M., Kunkel, T.J., Azaria, R.D., McLoughlin, H.S., Waghalter, M., Xu, Y., Schlame, M., Altan-Bonnet, N., Zheng, W., Lieberman, A.P., Dobrowolski, R., Storch, J., 2021. Enrichment of NPC1-deficient cells with the lipid LBPA stimulates autophagy, improves lysosomal function, and reduces cholesterol storage. *J. Biol. Chem.* 297, 100813. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100813>

- Ismaili, J., Rennesson, J., Aksoy, E., Vekemans, J., Vincart, B., Amraoui, Z., Van Laethem, F., Goldman, M., Dubois, P.M., 2002. Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 926–932.
- Ito, M., Tchoua, U., Okamoto, M., Tojo, H., 2002. Purification and properties of a phospholipase A2/lipase preferring phosphatidic acid, bis(monoacylglycerol) phosphate, and monoacylglycerol from rat testis. *J. Biol. Chem.* 277, 43674–43681. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202817200>
- Jesus-Santos, F.H., Lobo-Silva, J., Ramos, P.I.P., Descoteaux, A., Lima, J.B., Borges, V.M., Farias, L.P., 2020. LPG2 Gene Duplication in *Leishmania infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 408. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00408>
- Kallel, K., Pratlong, F., Belhadj, S., Cherif, F., Hammami, M., Dedet, J.P., Chaker, E., 2005. Cutaneous leishmaniasis in Tunisia: results of the iso-enzymatic characterization of 71 strains. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 99, 11–19. <https://doi.org/10.1179/136485905X19874>
- Kallel, K., Pratlong, F., Haouas, N., Kaouech, E., Belhadj, S., Anane, S., Dedet, J.P., Babba, H., Chaker, E., 2008. Isoenzymatic variability of *Leishmania infantum* in Tunisia concerning 254 human strains. *Acta Trop.* 106, 132–136. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2008.02.006>
- Kentala, H., Weber-Boyvat, M., Olkkonen, V.M., 2016. OSBP-Related Protein Family: Mediators of Lipid Transport and Signaling at Membrane Contact Sites. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 321, 299–340. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.09.006>
- Klein, M.E., Mauch, S., Rieckmann, M., Martínez, D.G., Hause, G., Noutsias, M., Hofmann, U., Lucas, H., Meister, A., Ramos, G., Loppnow, H., Mäder, K., 2020. Phosphatidylserine (PS) and phosphatidylglycerol (PG) nanodispersions as potential anti-inflammatory therapeutics: Comparison of in vitro activity and impact of pegylation. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* 23, 102096. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102096>
- Kobayashi, T., Beuchat, M.H., Lindsay, M., Frias, S., Palmiter, R.D., Sakuraba, H., Parton, R.G., Gruenberg, J., 1999. Late endosomal membranes rich in lysobisphosphatidic acid regulate cholesterol transport. *Nat. Cell Biol.* 1, 113–118. <https://doi.org/10.1038/10084>
- Kobayashi, T., Gu, F., Gruenberg, J., 1998. Lipids, lipid domains and lipid–protein interactions in endocytic membrane traffic. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 517–526. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0257>
- Kobayashi, Toshihide, Beuchat, M.-H., Chevallier, J., Makino, A., Mayran, N., Escola, J.-M., Lebrand, C., Cosson, P., Kobayashi, Tetsuyuki, Gruenberg, J., 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J. Biol. Chem.* 277, 32157–32164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202838200>

- Kolter, T., Sandhoff, K., 2005. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 81–103. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.120013>
- Kuda, O., 2017. Bioactive metabolites of docosahexaenoic acid. *Biochimie* 136, 12–20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.002>
- Kuhls, K., Chicharro, C., Cañavate, C., Cortes, S., Campino, L., Haralambous, C., Soteriadou, K., Pratlong, F., Dedet, J.-P., Mauricio, I., Miles, M., Schaar, M., Ochsenreither, S., Radtke, O.A., Schönian, G., 2008. Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e261. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000261>
- Kühn, H., 1996. Biosynthesis, metabolization and biological importance of the primary 15-lipoxygenase metabolites 15-hydro(pero)XY-5Z,8Z,11Z,13E-icosatetraenoic acid and 13-hydro(pero)XY-9Z,11E-octadecadienoic acid. *Prog. Lipid Res.* 35, 203–226. [https://doi.org/10.1016/s0163-7827\(96\)00008-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7827(96)00008-2)
- Kühne, V., Verstraete, R., van Ostade, X., Büscher, P., 2020. Experimental Evidence on the Nature of the Antigen in the Direct Agglutination Test for Visceral Leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 102, 788–796. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0784>
- Kumar, Ajay, Das, S., Mandal, A., Verma, S., Abhishek, K., Kumar, Ashish, Kumar, V., Ghosh, A.K., Das, P., 2018. *Leishmania* infection activates host mTOR for its survival by M2 macrophage polarization. *Parasite Immunol.* 40, e12586. <https://doi.org/10.1111/pim.12586>
- Kumar, G.A., Roy, S., Jafurulla, M., Mandal, C., Chattopadhyay, A., 2016. Statin-induced chronic cholesterol depletion inhibits *Leishmania donovani* infection: Relevance of optimum host membrane cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1858, 2088–2096. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.06.010>
- Kumar, P., Chatterjee, M., Das, N.K., 2021. Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis: Clinical Features and Differential Diagnosis. *Indian J. Dermatol.* 66, 24–33. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_602\\_20](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_602_20)
- Lacomble, S., Vaughan, S., Gadelha, C., Morphey, M.K., Shaw, M.K., McIntosh, J.R., Gull, K., 2010. Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.* 123, 2884–2891. <https://doi.org/10.1242/jcs.074161>
- Lal, C.S., Verma, R.B., Verma, N., Siddiqui, N.A., Rabidas, V.N., Pandey, K., Singh, D., Kumar, S., Paswan, R.K., Kumari, A., Sinha, P., Das, P., 2016. Hypertriglyceridemia: a possible diagnostic marker of disease severity in visceral leishmaniasis. *Infection* 44, 39–45. <https://doi.org/10.1007/s15010-015-0811-9>

Lands, W.E., Merkl, I., 1963. Metabolism of glycerolipids. III. Reactivity of various acyl esters of coenzyme A with alpha'-acylglycerophosphorylcholine, and positional specificities in lecithin synthesis. *J. Biol. Chem.* 238, 898–904.

Lang, T., Hellio, R., Kaye, P.M., Antoine, J.C., 1994. *Leishmania donovani*-infected macrophages: characterization of the parasitophorous vacuole and potential role of this organelle in antigen presentation. *J. Cell Sci.* 107, 2137–2150.

Lapara, N.J., Kelly, B.L., 2010. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. *J. Inflamm. Lond. Engl.* 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-8>

Lazardi, K., Urbina, J.A., de Souza, W., 1990. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34, 2097–2105. <https://doi.org/10.1128/aac.34.11.2097>

Le Faouder, P., Baillif, V., Spreadbury, I., Motta, J.-P., Rousset, P., Chêne, G., Guigné, C., Tercé, F., Vanner, S., Vergnolle, N., Bertrand-Michel, J., Dubourdeau, M., Cenac, N., 2013. 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, 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.06.014>

Lecoeur, H., Giraud, E., Prévost, M.-C., Milon, G., Lang, T., 2013. Reprogramming neutral lipid metabolism in mouse dendritic leucocytes hosting live *Leishmania amazonensis* amastigotes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2276. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002276>

Lee, J.M., Lee, H., Kang, S., Park, W.J., 2016. Fatty Acid Desaturases, Polyunsaturated Fatty Acid Regulation, and Biotechnological Advances. *Nutrients* 8, 23. <https://doi.org/10.3390/nu8010023>

Lee, S.H., Stephens, J.L., Englund, P.T., 2007. A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 287–297. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1617>

Lee, S.H., Stephens, J.L., Paul, K.S., Englund, P.T., 2006. Fatty Acid Synthesis by Elongases in Trypanosomes. *Cell* 126, 691–699. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.045>

Lefèvre, L., Lugo-Villarino, G., Meunier, E., Valentin, A., Olganier, D., Authier, H., Duval, C., Dardenne, C., Bernad, J., Lemesre, J.L., Auwerx, J., Neyrolles, O., Pipy, B., Coste, A., 2013. The C-type lectin receptors dectin-1, MR, and SIGNR3 contribute both positively and negatively to the macrophage response to *Leishmania infantum*. *Immunity* 38, 1038–1049. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.010>

Li, F., Zhu, A., Song, X., Ji, L., Wang, J., 2013. The internalization of fluorescence-labeled PLA nanoparticles by macrophages. *Int. J. Pharm.* 453, 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.033>

- Liévin-Le Moal, V., Loiseau, P.M., 2016. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. *FEBS J.* 283, 598–607. <https://doi.org/10.1111/febs.13601>
- Lima-Junior, D.S., Costa, D.L., Carregaro, V., Cunha, L.D., Silva, A.L.N., Mineo, T.W.P., Gutierrez, F.R.S., Bellio, M., Bortoluci, K.R., Flavell, R.A., Bozza, M.T., Silva, J.S., Zamboni, D.S., 2013. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. *Nat. Med.* 19, 909–915. <https://doi.org/10.1038/nm.3221>
- Lodge, R., Diallo, T.O., Descoteaux, A., 2006. Leishmania donovani lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell. Microbiol.* 8, 1922–1931. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00758.x>
- López-Muñoz, R.A., Molina-Berrios, A., Campos-Estrada, C., Abarca-Sanhueza, P., Urrutia-Llancaqueo, L., Peña-Espinoza, M., Maya, J.D., 2018. Inflammatory and Pro-resolving Lipids in Trypanosomatid Infections: A Key to Understanding Parasite Control. *Front. Microbiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01961>
- Luquain, C., Dolmazon, R., Enderlin, J.M., Laugier, C., Lagarde, M., Pageaux, J.F., 2000. Bis(monoacylglycerol) phosphate in rat uterine stromal cells: structural characterization and specific esterification of docosahexaenoic acid. *Biochem. J.* 351, 795–804.
- Luquain-Costaz, C., Lefai, E., Arnal-Levron, M., Markina, D., Sakai, S., Euthine, V., Makino, A., Guichardant, M., Yamashita, S., Kobayashi, T., Lagarde, M., Moulin, P., Delton-Vandenbroucke, I., 2013. Bis(monoacylglycerol)phosphate accumulation in macrophages induces intracellular cholesterol redistribution, attenuates liver-X receptor/ATP-Binding cassette transporter A1/ATP-binding cassette transporter G1 pathway, and impairs cholesterol efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 1803–1811. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301857>
- Luquain-Costaz, C., Rabia, M., Hullin-Matsuda, F., Delton, I., 2020. Bis(monoacylglycerol)phosphate, an important actor in the host endocytic machinery hijacked by SARS-CoV-2 and related viruses. *Biochimie* 179, 247–256. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.10.018>
- Machado, F.S., Mukherjee, S., Weiss, L.M., Tanowitz, H.B., Ashton, A.W., 2011. Bioactive lipids in Trypanosoma cruzi infection. *Adv. Parasitol.* 76, 1–31. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385895-5.00001-3>
- Makino, A., Ishii, K., Murate, M., Hayakawa, T., Suzuki, Y., Suzuki, M., Ito, K., Fujisawa, T., Matsuo, H., Ishitsuka, R., Kobayashi, T., 2006. D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol alters cellular cholesterol homeostasis by modulating the endosome lipid domains. *Biochemistry* 45, 4530–4541. <https://doi.org/10.1021/bi052104y>
- Malherbe, L., Filippi, C., Julia, V., Foucras, G., Moro, M., Appel, H., Wucherpfennig, K., Guéry, J.C., Glaichenhaus, N., 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4+



- T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13, 771–782. [https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)00075-3](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)00075-3)
- Martin, S.A., Brash, A.R., Murphy, R.C., 2016. The discovery and early structural studies of arachidonic acid. *J. Lipid Res.* 57, 1126–1132. <https://doi.org/10.1194/jlr.R068072>
- Martinez, F.O., Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>
- Marty, P., Lacour, J.P., Pratlong, F., Perrin, C., del Giudice, P., Le Fichoux, Y., 1998. [Localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum* MON-1 contracted in northern Algeria]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 1990 91, 146–147.
- Mason, R.J., Stossel, T.P., Vaughan, M., 1972. Lipids of alveolar macrophages, polymorphonuclear leukocytes, and their phagocytic vesicles. *J. Clin. Invest.* 51, 2399–2407.
- Mathur, R., Das, R.P., Ranjan, A., Shaha, C., 2015. Elevated ergosterol protects *Leishmania* parasites against antimony-generated stress. *FASEB J.* 29, 4201–4213. <https://doi.org/10.1096/fj.15-272757>
- Matsuo, H., Chevallier, J., Mayran, N., Le Blanc, I., Ferguson, C., Fauré, J., Blanc, N.S., Matile, S., Dubochet, J., Sadoul, R., Parton, R.G., Vilbois, F., Gruenberg, J., 2004. Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* 303, 531–534. <https://doi.org/10.1126/science.1092425>
- Matsuzawa, Y., Hostetler, K.Y., 1980. Studies on drug-induced lipidosis: subcellular localization of phospholipid and cholesterol in the liver of rats treated with chloroquine or 4,4'-bis (diethylaminoethoxy)alpha, beta-diethyldiphenylethane. *J. Lipid Res.* 21, 202–214.
- Mbongo, N., Loiseau, P.M., Billion, M.A., Robert-Gero, M., 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 352–357. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.2.352>
- McCauliff, L.A., Langan, A., Li, R., Ilnytska, O., Bose, D., Waghalter, M., Lai, K., Kahn, P.C., Storch, J., 2019. Intracellular cholesterol trafficking is dependent upon NPC2 interaction with lysobisphosphatidic acid. *eLife* 8, e50832. <https://doi.org/10.7554/eLife.50832>
- McConville, M.J., Mullin, K.A., Ilgoutz, S.C., Teasdale, R.D., 2002. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 66, 122–154; table of contents. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.1.122-154.2002>
- Mensa-Wilmot, K., Garg, N., McGwire, B.S., Lu, H.G., Zhong, L., Armah, D.A., LeBowitz, J.H., Chang, K.P., 1999. Roles of free GPIs in amastigotes of *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 99, 103–116. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(99\)00003-1](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(99)00003-1)

- Mitropoulos, P., Konidas, P., Durkin-Konidas, M., 2010. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63, 309–322. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.06.088>
- Moon, J.J., Suh, H., Polhemus, M.E., Ockenhouse, C.F., Yadava, A., Irvine, D.J., 2012. Antigen-displaying lipid-enveloped PLGA nanoparticles as delivery agents for a *Plasmodium vivax* malaria vaccine. *PLoS One* 7, e31472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031472>
- Moradin, N., Descoteaux, A., 2012. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 121. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2012.00121>
- Mosser, D.M., Edelson, P.J., 1985. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 135, 2785–2789.
- Mougneau, E., Bihl, F., Glaichenhaus, N., 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol. Rev.* 240, 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00983.x>
- Nadaes, N.R., Silva da Costa, L., Santana, R.C., LaRocque-de-Freitas, I.F., Vivarini, Á. de C., Soares, D.C., Wardini, A.B., Gazos Lopes, U., Saraiva, E.M., Freire-de-Lima, C.G., Decote-Ricardo, D., Pinto-da-Silva, L.H., 2020. DH82 Canine and RAW264.7 Murine Macrophage Cell Lines Display Distinct Activation Profiles Upon Interaction With *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 247. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00247>
- Naderer, T., McConville, M.J., 2008. The *Leishmania*–macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell. Microbiol.* 10, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x>
- Ndjamen, B., Kang, B.-H., Hatsuzawa, K., Kima, P.E., 2010. *Leishmania* parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments. *Cell. Microbiol.* 12, 1480–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01483.x>
- Nishihara, M., Morii, H., Koga, Y., 1982. Bis(monoacylglycero)phosphate in alkalophilic bacteria. *J. Biochem. (Tokyo)* 92, 1469–1479. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134071>
- O'Connor Butler, E.S., Mazerik, J.N., Cruff, J.P., Sherwani, S.I., Weis, B.K., Marsh, C.B., Raghavamenon, A.C., Uppu, R.M., Schmid, H.H.O., Parinandi, N.L., 2010. Lipoxygenase-catalyzed phospholipid peroxidation: preparation, purification, and characterization of phosphatidylinositol peroxides. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 610, 387–401. [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-029-8_23)
- Olivier, M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K., Shio, M.T., 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect., Special issue on virulence factors of parasites* 14, 1377–1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.05.014>

- Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 7, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2004.07.002>
- Paila, Y.D., Saha, B., Chattopadhyay, A., 2010. Amphotericin B inhibits entry of *Leishmania donovani* into primary macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 399, 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.07.099>
- Paloque, L., Perez-Berezo, T., Abot, A., Dalloux-Chioccioli, J., Bourgeade-Delmas, S., Faouder, P.L., Pujo, J., Teste, M.-A., François, J.-M., Schebb, N.H., Mainka, M., Rolland, C., Blanpied, C., Dietrich, G., Bertrand-Michel, J., Deraison, C., Valentin, A., Cenac, N., 2019. Polyunsaturated fatty acid metabolites: biosynthesis in *Leishmania* and role in parasite/host interaction. *J. Lipid Res.* 60, 636–647. <https://doi.org/10.1194/jlr.M091736>
- Parisi, L., Gini, E., Baci, D., Tremolati, M., Fanuli, M., Bassani, B., Farronato, G., Bruno, A., Mortara, L., 2018. Macrophage Polarization in Chronic Inflammatory Diseases: Killers or Builders? *J. Immunol. Res.* 2018, 8917804. <https://doi.org/10.1155/2018/8917804>
- Petavy, A.-F., Hormaeche, C., Lahmar, S., Ouhelli, H., Chabalgoity, A., Marchal, T., Azzouz, S., Schreiber, F., Alvite, G., Sarciron, M.-E., Maskell, D., Esteves, A., Bosquet, G., 2008. An oral recombinant vaccine in dogs against *Echinococcus granulosus*, the causative agent of human hydatid disease: a pilot study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e125. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000125>
- Pietrangelo, A., Ridgway, N.D., 2018. Bridging the molecular and biological functions of the oxysterol-binding protein family. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 75, 3079–3098. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2795-y>
- Pinot, M., Vanni, S., Pagnotta, S., Lacas-Gervais, S., Payet, L.-A., Ferreira, T., Gautier, R., Goud, B., Antonny, B., Barelli, H., 2014. Polyunsaturated phospholipids facilitate membrane deformation and fission by endocytic proteins. *Science* 345, 693–697. <https://doi.org/10.1126/science.1255288>
- Podinovskaia, M., Descoteaux, A., 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* 10, 111–129. <https://doi.org/10.2217/fmb.14.103>
- Polonio, T., Efferth, T., 2008. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products (Review). *Int. J. Mol. Med.* 22, 277–286. [https://doi.org/10.3892/ijmm\\_00000020](https://doi.org/10.3892/ijmm_00000020)
- Pratlong, F., Rioux, J.-A., Marty, P., Faraut-Gambarelli, F., Dereure, J., Lanotte, G., Dedet, J.-P., 2004. Isoenzymatic analysis of 712 strains of *Leishmania infantum* in the south of France and relationship of enzymatic polymorphism to clinical and epidemiological features. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4077–4082. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.9.4077-4082.2004>
- Price, H.P., Menon, M.R., Panethymitaki, C., Goulding, D., McKean, P.G., Smith, D.F., 2003. Myristoyl-CoA:protein N-myristoyltransferase, an essential enzyme and potential drug target

in kinetoplastid parasites. *J. Biol. Chem.* 278, 7206–7214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211391200>

Proudfoot, L., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y., 1995. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania major* inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.* 25, 745–750. <https://doi.org/10.1002/eji.1830250318>

Pucadyil, T.J., Chattopadhyay, A., 2006. Role of cholesterol in the function and organization of G-protein coupled receptors. *Prog. Lipid Res.* 45, 295–333. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.02.002>

Pucadyil, T.J., Tewary, P., Madhubala, R., Chattopadhyay, A., 2004. Cholesterol is required for *Leishmania donovani* infection: implications in leishmaniasis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 133, 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.002>

Rabhi, S., Rabhi, I., Trentin, B., Piquemal, D., Regnault, B., Goyard, S., Lang, T., Descoteaux, A., Enninga, J., Guizani-Tabbane, L., 2016. Lipid Droplet Formation, Their Localization and Dynamics during *Leishmania major* Macrophage Infection. *PloS One* 11, e0148640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148640>

Rabia, M., Leuzy, V., Soulage, C., Durand, A., Fourmaux, B., Errazuriz-Cerda, E., Köffel, R., Draeger, A., Colosetti, P., Jalabert, A., Di Filippo, M., Villard-Garon, A., Bergerot, C., Luquain-Costaz, C., Moulin, P., Rome, S., Delton, I., Hullin-Matsuda, F., 2020. Bis(monoacylglycero)phosphate, a new lipid signature of endosome-derived extracellular vesicles. *Biochimie, Biodiversity of lipid species – benefit for nutrition and effects on health* 178, 26–38. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.07.005>

Rådmark, O., Samuelsson, B., 2010. Regulation of the activity of 5-lipoxygenase, a key enzyme in leukotriene biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 396, 105–110. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.173>

Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M., Loiseau, P.M., 2005. Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 2677–2686. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.7.2677-2686.2005>

Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., Munder, M., 2014. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front. Immunol.* 5, 532. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00532>

Recchiuti, A., Serhan, C.N., 2012. Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) and Their Actions in Regulating miRNA in Novel Resolution Circuits in Inflammation. *Front. Immunol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00298>

Record, M., Amara, S., Subra, C., Jiang, G., Prestwich, G.D., Ferrato, F., Carrière, F., 2011. Bis (monoacylglycero) phosphate interfacial properties and lipolysis by pancreatic lipase-

related protein 2, an enzyme present in THP-1 human monocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1811, 419–430. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2011.04.008>

Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)

Reybier, K., Ribaut, C., Coste, A., Launay, J., Fabre, P.L., Nepveu, F., 2010. Characterization of oxidative stress in Leishmaniasis-infected or LPS-stimulated macrophages using electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 25, 2566–2572. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.04.021>

Ribeiro, H.A.L., Maioli, T.U., de Freitas, L.M., Tieri, P., Castiglione, F., 2017. Modeling Immune Response to Leishmania Species Indicates Adenosine As an Important Inhibitor of Th-Cell Activation. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00309>

Ricciotti, E., FitzGerald, G.A., 2011. Prostaglandins and Inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 986–1000. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207449>

Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J., 1990. Taxonomy of Leishmania. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* 65, 111–125. <https://doi.org/10.1051/parasite/1990653111>

Rodrigues, J.C.F., Bernardes, C.F., Visbal, G., Urbina, J.A., Vercesi, A.E., de Souza, W., 2007. Sterol Methenyl Transferase Inhibitors Alter the Ultrastructure and Function of the Leishmania amazonensis Mitochondrion Leading to Potent Growth Inhibition. *Protist* 158, 447–456. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2007.05.004>

Rodríguez, N.E., Gaur Dixit, U., Allen, L.-A.H., Wilson, M.E., 2011. Stage-specific pathways of Leishmania infantum chagasi entry and phagosome maturation in macrophages. *PloS One* 6, e19000. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019000>

Rodríguez, N.E., Gaur, U., Wilson, M.E., 2006. Role of caveolae in Leishmania chagasi phagocytosis and intracellular survival in macrophages. *Cell. Microbiol.* 8, 1106–1120. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2006.00695.x>

Rodriguez-Paris, J.M., Nolte, K.V., Steck, T.L., 1993. Characterization of lysosomes isolated from Dictyostelium discoideum by magnetic fractionation. *J. Biol. Chem.* 268, 9110–9116.

Ronet, C., Beverley, S.M., Fasel, N., 2011. Muco-cutaneous leishmaniasis in the New World: the ultimate subversion. *Virulence* 2, 547–552. <https://doi.org/10.4161/viru.2.6.17839>

Rossi, A., Marqués, J.M., Gavidia, C.M., Gonzalez, A.E., Carmona, C., García, H.H., Chabalgoity, J.A., 2012. Echinococcus granulosus: different cytokine profiles are induced by single versus multiple experimental infections in dogs. *Exp. Parasitol.* 130, 110–115. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.006>

- Salem, N.M., Lin, Y.H., Moriguchi, T., Lim, S.Y., Salem, N., Hibbeln, J.R., 2015. Distribution of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in the Whole Rat Body and 25 Compartments. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 100, 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.06.002>
- Schaible, U.E., Schlesinger, P.H., Steinberg, T.H., Mangel, W.F., Kobayashi, T., Russell, D.G., 1999. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 5), 681–693.
- Scheffter, S.M., Ro, Y.T., Chung, I.K., Patterson, J.L., 1995. The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology* 212, 84–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1456>
- Schneider, P., Rosat, J.P., Ransijn, A., Ferguson, M.A., McConville, M.J., 1993. Characterization of glycoinositol phospholipids in the amastigote stage of the protozoan parasite *Leishmania major*. *Biochem. J.* 295 ( Pt 2), 555–564. <https://doi.org/10.1042/bj2950555>
- Sehgal, K., Dhodapkar, K.M., Dhodapkar, M.V., 2014. Targeting human dendritic cells in situ to improve vaccines. *Immunol. Lett.* 162, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.07.004>
- Semini, G., Paape, D., Paterou, A., Schroeder, J., Barrios-Llerena, M., Aebischer, T., 2017. Changes to cholesterol trafficking in macrophages by *Leishmania* parasites infection. *MicrobiologyOpen* 6. <https://doi.org/10.1002/mbo3.469>
- Serezani, C.H., Perrela, J.H., Russo, M., Peters-Golden, M., Jancar, S., 2006. Leukotrienes are essential for the control of *Leishmania amazonensis* infection and contribute to strain variation in susceptibility. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 177, 3201–3208. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3201>
- Shaked-Mishan, P., Ulrich, N., Ephros, M., Zilberstein, D., 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* 276, 3971–3976. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005423200>
- Shinozaki, K., Waite, M., 1999. A novel phosphatidylglycerol-selective phospholipase A2 from macrophages. *Biochemistry* 38, 1669–1675. <https://doi.org/10.1021/bi982123q>
- Shio, M.T., Hassani, K., Isnard, A., Ralph, B., Contreras, I., Gomez, M.A., Abu-Dayyeh, I., Olivier, M., 2012. Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *J. Trop. Med.* 2012, 819512. <https://doi.org/10.1155/2012/819512>
- Showalter, M.R., Berg, A.L., Nagourney, A., Heil, H., Carraway, K.L., Fiehn, O., 2020. The Emerging and Diverse Roles of Bis(monoacylglycero) Phosphate Lipids in Cellular Physiology and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 8067. <https://doi.org/10.3390/ijms21218067>

- Singh, N., Bajpai, S., Kumar, V., Gour, J.K., Singh, R.K., 2013. Identification and functional characterization of *Leishmania donovani* secretory peroxidase: delineating its role in NRAMPI1 regulation. *PloS One* 8, e53442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053442>
- Soto, J., Berman, J., 2006. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100 Suppl 1, S34-40. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.02.022>
- Späth, G.F., Garraway, L.A., Turco, S.J., Beverley, S.M., 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 9536–9541. <https://doi.org/10.1073/pnas.1530604100>
- Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M.R., Postorino, M.C., Cosentino, S., Serra, A., Cacopardo, B., Nunnari, G., 2013. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. *BioMed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/805108>
- Strokin, M., Sergeeva, M., Reiser, G., 2003. Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca<sup>2+</sup>. *Br. J. Pharmacol.* 139, 1014–1022. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705326>
- Sundar, S., Rai, M., 2002. Laboratory Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 951–958. <https://doi.org/10.1128/CDLI.9.5.951-958.2002>
- Sundar, S., Singh, R.K., Bimal, S.K., Gidwani, K., Mishra, A., Maurya, R., Singh, S.K., Manandhar, K.D., Boelaert, M., Rai, M., 2007. Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 12, 284–289. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01775.x>
- Suzuki, E., Tanaka, A.K., Toledo, M.S., Takahashi, H.K., Straus, A.H., 2002. Role of beta-D-galactofuranose in *Leishmania major* macrophage invasion. *Infect. Immun.* 70, 6592–6596. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.12.6592-6596.2002>
- t'Kindt, R., Scheltema, R.A., Jankevics, A., Brunker, K., Rijal, S., Dujardin, J.-C., Breitling, R., Watson, D.G., Coombs, G.H., Decuyper, S., 2010. Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e904. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000904>
- Tallima, H., El Ridi, R., 2017. Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *J. Adv. Res.* 11, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.11.004>
- Tavares, N., Afonso, L., Suarez, M., Ampuero, M., Prates, D.B., Araújo-Santos, T., Barral-Netto, M., DosReis, G.A., Borges, V.M., Brodskyn, C., 2016. Degranulating Neutrophils Promote Leukotriene B4 Production by Infected Macrophages To Kill *Leishmania amazonensis*

Parasites. J. Immunol. Baltim. Md 1950 196, 1865–1873.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1502224>

Tavares, N.M., Araújo-Santos, T., Afonso, L., Nogueira, P.M., Lopes, U.G., Soares, R.P., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., Borges, V.M., Brodskyn, C., 2014. Understanding the Mechanisms Controlling *Leishmania amazonensis* Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. *J. Infect. Dis.* 210, 656–666.  
<https://doi.org/10.1093/infdis/jiu158>

Thanou, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E., 2001. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. *Adv. Drug Deliv. Rev., Drug Delivery Applications of Chitosan* 52, 117–126. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(01\)00231-9](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(01)00231-9)

Thomaidou, E., Horev, L., Jotkowitz, D., Zamir, M., Ingber, A., Enk, C.D., Molho-Pessach, V., 2015. Lymphatic Dissemination in Cutaneous Leishmaniasis Following Local Treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 93, 770–773. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0787>

Thomazelli, A.P.F.D.S., Tomiotto-Pellissier, F., Miranda-Sapla, M.M., da Silva, S.S., Alvarenga, D.S., Panis, C., Cataneo, A.H.D., Bordignon, J., Silveira, G.F., Yamauchi, L.M., de Sá, J.P.S.R., Felipe, I., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., 2018. Concanavalin-A displays leishmanicidal activity by inducing ROS production in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 40, 387–392.  
<https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1510960>

Thornburg, T., Miller, C., Thuren, T., King, L., Waite, M., 1991. Glycerol reorientation during the conversion of phosphatidylglycerol to bis(monoacylglycerol)phosphate in macrophage-like RAW 264.7 cells. *J. Biol. Chem.* 266, 6834–6840. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)89576-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)89576-3)

Tomiotto-Pellissier, F., Bortoleti, B.T. da S., Assolini, J.P., Gonçalves, M.D., Carloto, A.C.M., Miranda-Sapla, M.M., Conchon-Costa, I., Bordignon, J., Pavanelli, W.R., 2018. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. *Front. Immunol.* 9, 2529.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02529>

Tripathi, P., Singh, V., Naik, S., 2007. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 229–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00311.x>

Tyler, B., Gullotti, D., Mangraviti, A., Utsuki, T., Brem, H., 2016. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 107, 163–175.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.018>

Ueno, N., Wilson, M.E., 2012. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Trends Parasitol.* 28, 335–344.  
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.05.002>



- Uttaro, A.D., 2014. Acquisition and biosynthesis of saturated and unsaturated fatty acids by trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 196, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.04.001>
- Vallochi, A.L., Teixeira, L., Oliveira, K. da S., Maya-Monteiro, C.M., Bozza, P.T., 2018. Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite Interactions. *Front. Immunol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01022>
- van Meer, G., Voelker, D.R., Feigenson, G.W., 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 112–124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Veras, P.S.T., de Menezes, J.P.B., Dias, B.R.S., 2019. Deciphering the Role Played by Autophagy in Leishmania Infection. *Front. Immunol.* 10, 2523. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02523>
- Vida, C., de Toda, I.M., Cruces, J., Garrido, A., Gonzalez-Sanchez, M., De la Fuente, M., 2017. Role of macrophages in age-related oxidative stress and lipofuscin accumulation in mice. *Redox Biol.* 12, 423–437. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.03.005>
- Vinet, A.F., Fukuda, M., Turco, S.J., Descoteaux, A., 2009. The Leishmania donovani Lipophosphoglycan Excludes the Vesicular Proton-ATPase from Phagosomes by Impairing the Recruitment of Synaptotagmin V. *PLoS Pathog.* 5. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000628>
- Vinet, A.F., Jananji, S., Turco, S.J., Fukuda, M., Descoteaux, A., 2011. Exclusion of synaptotagmin V at the phagocytic cup by Leishmania donovani lipophosphoglycan results in decreased promastigote internalization. *Microbiol. Read. Engl.* 157, 2619–2628. <https://doi.org/10.1099/mic.0.050252-0>
- Waite, M., Roddick, V., Thornburg, T., King, L., Cochran, F., 1987. Conversion of phosphatidylglycerol to lyso(bis)phosphatidic acid by alveolar macrophages. *FASEB J.* 1, 318–325. <https://doi.org/10.1096/fasebj.1.4.3653583>
- Wei, F., Gong, W., Wang, J., Yang, Y., Liu, J., Wang, Y., Cao, J., 2019. Role of the lipoxin A4 receptor in the development of neutrophil extracellular traps in Leishmania infantum infection. *Parasit. Vectors* 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3530-8>
- Wheeler, R.J., Sunter, J.D., Gull, K., 2016. Flagellar pocket restructuring through the Leishmania life cycle involves a discrete flagellum attachment zone. *J. Cell Sci.* 129, 854–867. <https://doi.org/10.1242/jcs.183152>
- WHO | Epidemiological situation [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> (accessed 12.11.19).
- Williams, K.I., Higgs, G.A., 1988. Eicosanoids and inflammation. *J. Pathol.* 156, 101–110. <https://doi.org/10.1002/path.1711560204>

- Winter, G., Fuchs, M., McConville, M.J., Stierhof, Y.D., Overath, P., 1994. Surface antigens of *Leishmania mexicana* amastigotes: characterization of glycoinositol phospholipids and a macrophage-derived glycosphingolipid. *J. Cell Sci.* 107, 2471–2482. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.9.2471>
- Wright, M.H., Heal, W.P., Mann, D.J., Tate, E.W., 2010. Protein myristoylation in health and disease. *J. Chem. Biol.* 3, 19–35. <https://doi.org/10.1007/s12154-009-0032-8>
- Wright, M.H., Paape, D., Storck, E.M., Serwa, R.A., Smith, D.F., Tate, E.W., 2015. Global analysis of protein N-myristoylation and exploration of N-myristoyltransferase as a drug target in the neglected human pathogen *Leishmania donovani*. *Chem. Biol.* 22, 342–354. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.01.003>
- Wu, S.-R.J., Khoriaty, R., Kim, S.H., O’Shea, K.S., Zhu, G., Hoenerhoff, M., Zajac, C., Oravec-Wilson, K., Toubai, T., Sun, Y., Ginsburg, D., Reddy, P., 2019. SNARE protein SEC22B regulates early embryonic development. *Sci. Rep.* 9, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46536-7>
- Xu, W., Hsu, F.-F., Baykal, E., Huang, J., Zhang, K., 2014. Sterol biosynthesis is required for heat resistance but not extracellular survival in *Leishmania*. *PLoS Pathog.* 10, e1004427. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004427>
- Yoneyama, K.A.G., Tanaka, A.K., Silveira, T.G.V., Takahashi, H.K., Straus, A.H., 2006. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *J. Lipid Res.* 47, 2171–2178. <https://doi.org/10.1194/jlr.M600285-JLR200>
- Young, J., Kima, P.E., 2019. The *Leishmania* Parasitophorous Vacuole Membrane at the Parasite-Host Interface. *Yale J. Biol. Med.* 92, 511–521.
- Zhang, K., Beverley, S.M., 2010. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 170, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.12.004>
- Zhang, W., McManus, D.P., 2008. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus*: a means to control hydatid disease? *Trends Parasitol.* 24, 419–424. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2008.05.008>
- Zhao, L., Seth, A., Wibowo, N., Zhao, C.-X., Mitter, N., Yu, C., Middelberg, A.P.J., 2014. Nanoparticle vaccines. *Vaccine* 32, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.069>
- Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W., Almeida, I.C., Smith, D.F., Turco, S.J., Ferguson, M.A.J., Beverley, S.M., 2003. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* 278, 44708–44718. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308063200>