

PRIX EUGÈNE YOURASSOWSKY

2016

16 NOVEMBRE 2016

Pour tout renseignement:

M. Bruno MORAUX

F.R.S.-FNRS

prix@frs-fnrs.be

02/504.92.40

EUGÈNE YOURASSOWSKY

Le Docteur Eugène Yourassowsky est né à Bruxelles le 1^{er} août 1929 et y est décédé le 12 mars 1994. Ses travaux de recherche en microbiologie et en particulier sur les mécanismes d'action des antibiotiques ont fait de lui un spécialiste de renommée mondiale.

Après des études secondaires faites à l'athénée de St-Gilles, il s'inscrit à l'Université Libre de Bruxelles et y décroche en juillet 1955 son diplôme de Docteur en Médecine, Chirurgie et Accouchements. Plutôt que de faire son service militaire, il choisit le service civil. Avec sa jeune femme, il est envoyé au Rwanda pour y travailler dans un dispensaire (comme seul médecin). Indépendamment de l'amour indéfectible pour l'Afrique subsaharienne que va susciter ce séjour, ces 3 années africaines vont être d'une importance capitale dans son orientation professionnelle : c'est au Rwanda qu'il va découvrir le monde des agents pathogènes et des maladies dont ils sont responsables.



Il y était par ailleurs confronté au manque de moyens face à l'immensité de la tâche et de la diversité des soins à prodiguer. Mais son talent et son imagination pour mettre au point des « systèmes D » lui permettaient souvent de résoudre les problèmes. Une de ses chercheuses se rappelle du précieux conseil qu'il lui avait un jour donné : « *Si vous n'avez pas les moyens pour réaliser ce que vous voulez faire, inventez le système qui vous permettra d'y parvenir.* »

De retour en Belgique, il est engagé à l'Hôpital Brugmann dans le Service de Médecine Interne du Professeur Lambert. Son tropisme pour les maladies infectieuses l'amène à développer le laboratoire de microbiologie au sein de cet hôpital ; mais interniste de formation, il placera toujours le malade au centre de ses préoccupations et accordera une importance primordiale au dialogue entre le laboratoire et les cliniciens pour établir un diagnostic correct. Par ailleurs, il estimait qu'un bon résultat était le fruit d'un travail d'équipe et qu'à ce titre tout membre de l'équipe méritait estime et respect quels que soient son grade ou sa couleur de peau. Travailler dans son laboratoire était donc considéré comme un privilège et expliquait qu'il était entouré d'une équipe de collaborateurs enthousiastes et dévoués avec lesquels il put créer une unité de recherches axées principalement sur le

mode d'action des antibiotiques tant in vitro qu'in vivo. La qualité de ses travaux et de ses publications va lui assurer une réputation d'abord nationale puis internationale, justifiant les aides financières qu'il va recevoir et les contrats de recherche qu'il va signer avec les firmes pharmaceutiques.

Comme tout médecin travaillant en milieu universitaire, Eugène Yourassowsky avait aussi, à côté de ses fonctions de clinique et de recherche, une fonction d'enseignement qu'il assurait avec brio. Professeur de microbiologie en Faculté de Médecine de l'ULB, il a enthousiasmé des générations d'étudiants auxquels il a communiqué sa passion pour la microbiologie et la pathologie infectieuse. Son cours était vivant, imagé et truffé d'anecdotes.

Une biographie du Docteur Yourassowsky limitée aux seuls aspects de sa carrière médicale serait incomplète. Ce qui distinguait cet homme de bien de ses collègues c'était ses qualités humaines : « *Monsieur Youra* » comme le nommaient la plupart des gens, était un homme chaleureux, à l'écoute bienveillante et empathique, toujours disponible pour aider ceux qui venaient chercher un conseil ou un réconfort auprès de lui. Son honnêteté tant intellectuelle que morale lui conférait une autorité rarement contestée. Par ailleurs, sa vaste culture générale, son goût pour l'art et ses dons artistiques personnels faisaient de lui un interlocuteur passionnant que ses collègues belges ou étrangers rencontraient toujours avec plaisir.

Eugène Yourassowsky était un bourreau du travail. Il trouvait néanmoins le temps de s'occuper de sa famille qui tenait une place importante dans son cœur ; ses enfants lui sont reconnaissants d'avoir, dès leur plus jeune âge, éveillé leur curiosité qu'elle soit scientifique ou artistique, et encouragé les dons qu'il décelait chez eux.

Voilà pourquoi, à son décès survenu en mars 1994 à l'âge de 64 ans, sa famille et ses proches collaborateurs ont voulu perpétuer son souvenir en créant une Fondation dont les buts refléteraient les objectifs qu'il avait toujours cherché à atteindre.

Par un Prix attribué tous les deux ans, la Fondation avait pour but de récompenser un travail de recherche en microbiologie clinique ou en pathologie infectieuse, réalisé en Belgique, dans une institution à caractère universitaire, par un candidat âgé de moins de 45 ans et titulaire d'un diplôme universitaire belge.

Dix lauréats à ce jour ont été distingués par ce Prix, appartenant aux différentes institutions universitaires belges.

Les membres de la Fondation sont particulièrement reconnaissants au F.R.S. - FNRS et au FWO, auxquels les fonds ont été cédés, d'avoir accepté cette mission et de respecter les buts que la Fondation a poursuivis jusqu'ici.

PRIX EUGÈNE YOURASSOWSKY

- Le Prix Eugène YOURASSOWSKY 2016, qui récompense une thèse de doctorat dans le domaine de la microbiologie médicale et les maladies infectieuses, a été attribué à :

Gilles VANWALLEGHEM

Docteur en Sciences - ULB

Licence en Biologie Moléculaire - ULB

EMBO long-term Fellow - The University of Queensland, Australie

pour son travail :

Adaptation de *Trypanosoma brucei* aux protéines de l'immunité innée TNF- α et ApoL1.

Ce travail a permis l'identification de 3 canaux chlores chez *Trypanosoma brucei*, le parasite responsable de la maladie du sommeil. Un de ces canaux chlores semble impliqué dans la destruction du parasite par la protéine d'immunité innée ApoL1. Ces travaux nous ont dirigés vers une meilleure compréhension du mécanisme de mort cellulaire du parasite par l'ApoL1, passant par une perméabilisation de la mitochondrie.

Nous avons également découverts une nouvelle fonction des adénylates cyclase (AC) de *T.brucei* dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Leur activation lors de la phagocytose par les cellules myéloïdes de l'hôte réduit la réponse innée précoce à l'infection. Cette fonction des AC à l'interface entre le parasite et l'hôte pourrait expliquer l'expansion de cette famille de protéines chez ce parasite pour échapper à la réponse humorale.

MEMBRES DU JURY PRIX EUGÈNE YOURASSOWSKY 2016

- | | | |
|----|--|---|
| M. | GILLET Laurent | Professeur à l'ULg |
| M. | HALLEZ Régis | Chercheur qualifié du F.R.S.-FNRS à l'UNamur |
| M. | MAHILLON Jacques | Professeur à l'UCL |
| M. | SMEESTERS Pierre | Professeur à l'ULB Chef de service et Chef du Département de Pédiatrie à l'HUDERF |
| M. | VANDERPAS Jean Président du Jury | Professeur à l'UNamur Directeur du Laboratoire de Microbiologie Médical de l'Institut Scientifique de Santé Publique |

Gilles VANWALLEGHEM

ULB

“Adaptation de Trypanosoma brucei aux protéines de l’immunité innée TNF- α et ApoL-1”



Résumé

Trypanosoma brucei est un parasite flagellé extracellulaire qui provoque la trypanosomiase africaine chez les mammifères, dont l'homme. Ce parasite est transmis par la morsure des mouches glossines (dite tsé-tsé) et est endémique de l'Afrique subsaharienne. Il y a deux étapes à l'infection, une phase sanguine et une phase neurologique, d'où provient son surnom de maladie du sommeil. Lors de la phase sanguine, la charge parasitaire de *T.brucei* évolue par pics successifs, le système immunitaire de l'hôte produit des anticorps qui élimine la majorité des parasites. Néanmoins, *T.brucei* possède un mécanisme de défense évolué, la variation antigénique du manteau de protéines qui le recouvre complètement, qui lui permet de changer *ad infinitum* ce manteau [1]. Ce nouveau manteau de protéines permet à une partie de la population de survivre en échappant à la réponse humorale, leur croissance atteint un nouveau pic et le cycle recommence, ceci tout au long de l'infection et jusqu'à la mort de l'hôte. Après plusieurs épidémies mortelles, le niveau d'infection est actuellement limité grâce au contrôle du vecteur avec moins de 5 000 nouveaux cas humains par an. Malgré cela, le coût économique reste important (jusqu'à 5 milliards de \$ d'après la FAO), surtout dû à l'infection du bétail et il y a un manque de nouveaux traitements efficaces pour l'homme ou l'animal.

En tant que parasite extracellulaire, le trypanosome est exposé pleinement à la force du système immunitaire de son hôte, cette pression de sélection engendre une course à l'armement entre le parasite et l'hôte. Un exemple concret fut l'émergence d'une protéine humaine mortelle pour le trypanosome, l'apolipoprotéine L-1 (APOL1) présente dans le sérum [2]. Cette protéine d'immunité innée appartient à une vaste famille de protéines, au nombre de 7 chez l'homme, elle se retrouve dans le sang, associée aux « high-density lipoproteins » les autres membres étant intracellulaires. Cette nouvelle pression de sélection fut contrée par une protéine appelée « Serum Resistance Associated protein » qui est présente chez la sous-espèce *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Cette protéine est nécessaire et suffisante à la survie de *T.b.rhodesiense* chez l'homme, l'autre sous-espèce infectieuse pour l'homme, *T.b.gambiense* combine plusieurs outils pour résister à l'APOL1 [3].

Notre hypothèse était que l'APOL1 pénètre dans *T.brucei* par la voie endocytaire, l'acidification provoque un changement de conformation qui permet à la protéine de s'insérer dans la membrane du lysosome. Elle y agit comme un canal anionique permettant une entrée massive de chlore dans le lysosome. Cette entrée massive de chlore provoque un déséquilibre osmotique qui mène au gonflement du lysosome, ce qui entraîne la mort du parasite.

Le génome de *T.brucei* contient 3 gènes codants pour des membres de la famille de canaux chlore CLC, *TbCLC-a*, *TbCLC-b*, *TbCLC-c*. *TbCLC-b* montre un profil similaire aux canaux de la famille CLC, *TbCLC-a* et *-c* montrent un profil d'antiport chlore/proton. Cependant, aucune de ces protéines n'ont été trouvées à la surface du parasite dans les études protéomiques, ni dans nos immunofluorescences. Nous avons pu montrer que les 3 gènes étaient capables de transporter le chlore quand exprimé dans des oocytes de Xénope. De plus, lorsque nous avons réduit le niveau d'expression d'un des gènes chez *T.brucei* par ARN interférent (*TbCLC-*

b), la lyse par l'APOL1 était significativement ralentie. Ces résultats montrent que le chlore est effectivement impliqué dans la lyse par l'APOL1 et que *TbCLC-b* pourrait y jouer un rôle direct ou indirect par un effet sur l'acidification de la voie endocyttaire ou le trafic vésiculaire.

Durant notre étude du rôle de la lyse par le sérum humain, nous avons observés des parasites ne présentant pas de gonflement lysosomal préalable à leur mort. Ces observations ont remis en doute notre hypothèse de mort provoquée par le gonflement du lysosome, des expériences complémentaires, à la suite de notre thèse de doctorat, nous ont permis de révéler un processus complexe. Brièvement, il est possible de dissocier gonflement du lysosome et mort du parasite en milieu hyperosmotique. La lyse par l'APOL1 ressemble alors à une mort cellulaire programmée impliquant la perméabilisation de la mitochondrie, une kinésine, *TbKIFC1*, serait responsable du transport de l'APOL1 de la membrane endosomale à la mitochondrie [4].

Un autre exemple que nous avons étudié est la protéine d'immunité innée « tumor necrosis factor- α » (TNF). Le TNF est l'acteur principal du contrôle précoce de l'infection par *T.brucei*, les souris knock-out pour le TNF montrent une charge parasitaire plus importante lors des pics d'infection, mais une pathologie réduite.

Le génome de *T.brucei* compte un nombre étonnant, pour un unicellulaire, de gènes codants pour des adénylate cyclases (AC), plus de 80 au total. Un nombre largement supérieur à celui de parasites intracellulaires proches comme *Trypanosoma cruzi* dont le génome n'encode que 9 AC. Ce nombre est doublement étonnant car la « protéin kinase A » (PKA) semble insensible à l'AMP cyclique chez *T.brucei*, néanmoins des effecteurs ont récemment été identifiés, les « cAMP Response Proteins » [5]. Les AC de *T.brucei* possèdent un domaine extracellulaire qui pourrait agir comme récepteur, une traversée membranaire et un domaine catalytique nécessitant une dimérisation pour être actif. Cette dimérisation est initié en cas de stress cellulaire (acide, osmotique, lyse...), mais malgré la présence d'un possible domaine récepteur aucun ligand n'a été identifié jusqu'à présent.

Nous avons étudié la fonction que les nombreuses adénylate cyclase de *T.brucei* pourraient jouer dans les relations hôtes pathogènes. Avec plus de 80 gènes, une approche génétique classique ne pouvait être utilisée, le coauteur Prof. Salmon a muté deux acides aminés responsables de la dimérisation pour obtenir un dominant négatif (DN) des AC de *T.brucei*. Cette approche permet une réduction de moitié de l'activité cyclase dans les parasites exprimant de façon constitutive le dominant négatif (DNc).

La charge parasitaire de souris infectées par *T.brucei* DNc est réduite de ~100x et leur survie prolongée de deux à trois fois comparé à l'infection par une souche sauvage. Ce phénotype d'infection atténué est conservé dans des souris déficientes en lymphocytes T, B ou les deux ; par contre les parasites DNc se comportent comme la souche sauvage si les souris sont injectées avec des liposomes contenant du clodronate, ce qui a pour effet d'éliminer les cellules phagocytaires. Dans des souris déficientes en TNF, la charge parasitaire et la survie reviennent à des niveaux similaires à la souche sauvage. En plus du TNF, l'interféron- γ (IFN- γ) et l'oxyde nitrique (NO) sont les immunomodulateurs principaux impliqués dans le contrôle de l'infection par l'hôte. L'infection par DNc reste atténuée dans des souris déficientes dans la production de NO, mais pour les souris déficientes en IFN- γ la situation est similaire au TNF, malgré un premier pic de parasites DNc atténué. Le TNF apparaît donc comme l'acteur principal affecté par le dominant négatif.

Le foie est l'organe principal d'interaction entre les parasites et les cellules immunitaires, nous y avons donc concentrés nos efforts. Quatre jours après l'infection, le nombre de cellules CD11b⁺ produisant du TNF est plus haut chez les souris infectées par le parasite DNc, par rapport à la souche sauvage. En particulier, le nombre de monocytes inflammatoires et de cellules dendritiques inflammatoires est augmenté, mais le nombre de macrophages est diminué dans l'infection par les DNc. Dans toutes ces populations, la proportion de cellules produisant du TNF est 2.5 fois plus élevé chez les souris infectées par les DNc. La diminution de l'activité cyclase du parasite mène donc à une expansion de la population de cellules myéloïdes du foie produisant du TNF.

Pour évaluer si ces effets nécessitent une interaction directe entre les parasites et les cellules myéloïdes, nous avons utilisé des parasites exprimant soit la protéine fluorescente « GFP » soit une fusion DN-GFP. En sélectionnant les cellules myéloïdes fluorescentes, nous avons pu montrer que le niveau intracellulaire de TNF était deux à quatre fois plus élevé avec les parasites DN par rapport aux contrôles. Une réduction de l'activité cyclase des parasites est associée à une augmentation de la production de TNF chez les cellules myéloïdes.

Nous avons alors mesuré l'activité PKA des cellules myéloïdes de souris infectée par des parasites contrôles ou DNc. Une augmentation de l'activité PKA est observée dans les cellules myéloïdes de souris infectée par le parasite contrôle, mais pas lors de l'infection par le parasite DNc. Nous avons également spécifiquement inhibé l'activité PKA dans les cellules myéloïdes des souris hôtes par une approche génétique, la charge parasitaire est alors réduite de moitié avec un phénotype rappelant l'infection par les DNc.

En résumé, Nous avons découverts une nouvelle fonction des AC de *T.brucei* dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte. L'activation des AC de *T.brucei* par le stress lors de la phagocytose par les cellules myéloïdes de l'hôte réduit la réponse innée précoce à l'infection. Cette fonction des AC à l'interface entre le parasite et l'hôte pourrait expliquer l'expansion de cette famille de protéines chez ce parasite extracellulaire pour échapper à la réponse humorale.

1. Pays E., Vanhamme L., Pérez-Morga D. 2004. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei*: facts, challenges and mysteries. *Curr Opin Microbiol*.

2. Pérez-Morga D. *et al.* 2005 Apolipoprotein L-I promotes trypanosome lysis by forming pores in lysosomal membranes. *Science*.

3. Pays E. *et al.* 2014. The molecular arms race between African trypanosomes and humans. *Nat.Rev.Microbiol*.

4. Vanwalleghem G. *et al.* 2015. Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1. *Nat.Commun*.

5. Gould MK. *et al.* 2013. Cyclic AMP effectors in African trypanosomes revealed by genome-scale RNA interference library screening for resistance to the phosphodiesterase inhibitor CpdA. *Antimicrob Agents Chemother*.

Curriculum Vitae

Name Vanwalleghem Gilles Claude **Marital status** Married
Birthday 30 November 1980
Nationality Belgian
Address 63 Bishop St., St Lucia
Zip code QLD 4067 **Country** Australia
Phone +61 431 980 842
E-mail Gilles.Vanwalleghem@gmail.com

Publications

Peer-reviewed article (h-index = 3)

“Activation of protein kinase C and inositol 1,4,5-triphosphate receptors antagonistically modulate voltage-gated sodium channels in striatal neurons.”

Hourez R*, Azdad K*, Vanwalleghem G*, Roussel C, Gall D, Schiffmann SN.e
[Brain Res.](#) 2005 Oct 19;1059(2):189-96. doi:10.1016/j.brainres.2005.08.031

* These authors contributed equally to this work.

“Adenylate Cyclases of Trypanosoma brucei Inhibit the Innate Immune Response of the Host.”

Salmon D*, Vanwalleghem G*, Morias Y, Denoëud J, Krumbholz C, Lhommé F, Bachmaier S, Kador M, Gossmann J, Dias FB, De Muylder G, Uzureau P, Magez S, Moser M, De Baetselier P, Van Den Abbeele J, Beschin A, Boshart M, Pays E.

[Science.](#) 2012 Jul 27;337(6093):463-6. doi: 10.1126/science.1222753

* These authors contributed equally to this work.

“Coupling of lysosomal and mitochondrial membrane permeabilization in trypanolysis by APOL1”

Vanwalleghem G*, Fontaine F*, Lecordier L, Tebabi P, Klewe K, Nolan DP, Yamaro-Botté Y, Botté C, Kremer A, Burkard GS, Rassow J, Roditi I, Pérez-Morga , Pays E

[Nat Commun.](#) 2015 Aug 26;6:8078. doi: 10.1038/ncomms9078

* These authors contributed equally to this work.

“Functional profiles of visual, auditory, and water flow responsive neurons in the zebrafish tectum”

Thompson AW, Vanwalleghem GC, Heap LA, and Scott EK

[Current Biol.](#) 2016, in press. doi: 10.1016/j.cub.2016.01.041

Teaching activities

2009-2012 Founder and instructor of the ULB-Brussels iGEM team

2008 Junior lecturer for Essencia “Chemistry and young people”

Patents

“Biological glue and method for obtaining a biological glue”

US 2011/0284161 A1

“Method and system for the production of recombinant proteins by cells”

EP2015/065350

Talks/conferences

2008 “Study of the *Trypanosoma brucei* chloride channels, and their involvement in lysis by apolipoprotein L-1” poster, Annual meeting of the Brazilian society of protozoology, Brazil

2009 “Characterization of chloride channels in *Trypanosoma brucei*” Talk, Annual meeting of the Belgian society of protozoology, Belgium

2011 “Characterization of the Adenylate cyclase of *T. brucei* and host-pathogen interactions” Talk, Annual meeting of the Belgian society of protozoology, Belgium

2012 “In-vivo imaging and the role of the adenylate cyclases of *Trypanosoma brucei* during infection” Talk, Annual Molecular Parasitology Meeting, Woods Hole, MA, USA

2012 “Host immune response modulation by *Trypanosoma brucei* : recent developments” Microbiology and infectious diseases talk, Erasme hospital, Belgium

2015 “Sensory integration in the Zebrafish brain, what are the functions of the thalamus and the cerebellum ?” Neuroinformatics 2015, Cairns, Australia

PhD Thesis

Vanwalleghem G. (2012) “Adaptations of *Trypanosoma brucei* to the innate immunity proteins TNF- α and ApoL-1”

Master Thesis

Vanwalleghem G. (2005) “Sodium current modulation in striatal neurons: Study by electrophysiology and single cell RT-PCR”

Awards

2006 FNRS, Research fellow

2009 iGEM, Best New BioBrick Part, Natural

2010 EMBO, short-term fellowship : Study of *Trypanosoma* chloride channels

2014 EMBO, long-term fellowship : Functional links among cerebellum, optic tectum and thalamus and their implication in sensory integration

Education

[Université Libre de Bruxelles](#) Brussels, Belgium (2005-2012)

Doctor of Philosophy in science under the supervision of Etienne Pays

[Université Libre de Bruxelles](#) Brussels, Belgium (2001-2005)

M.S. Molecular biology *summa cum laude*

Lauréats du Prix Eugène Yourassowsky

- 2012 : Bénédicte MACHIELS, ULg
 - 2016 : Gilles VANWALLEGHEM, ULB
-