



Analyse protéomique comparative : Première description de différences quantitatives et qualitatives de protéines plasmatiques humaines de deux groupes de patients pédiatriques traités et suivis pour l'échinococcose kystique

Eya Ben Salah^{1,2,3}, Wahiba Sakly¹, Coralie Barrera^{2,3}, Sana Mosbahi⁴, Thierry Balliau⁵, Bruno Gottstein⁶, Amine Ksia⁴, Mohsen Belguith⁴, Hamouda Babba¹ & Laurence Millon^{2,3}

¹ Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale et Moléculaire, LR12ES08, Université de Monastir, Tunisie

² National French Reference Centre for Echinococcosis and University Bourgogne Franche-Comté, chronoenvironnement CNRS-6249, FR-25030 Besançon, France

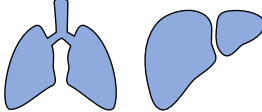
³ Paediatric Surgery Department, Fattouma Bourguiba Hospital, Monastir, Medical School, Tunisia.

⁴ PAPPISO, GQE – Le Moulon, INRA, Université de Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-sur-Yvette, France

⁵ Institute for Infectious Diseases, University of Bern, Bern, Switzerland

Introduction

❑ Echinococcose kystique (EK) : parasitose due au développement du métacestode d'*Echinococcus granulosus sensu lato*.

❑ Forme : kyste hydatique 

❑ Distribution globale, régions rurales

❑ Problème majeur de santé publique dans le monde et en Tunisie ++

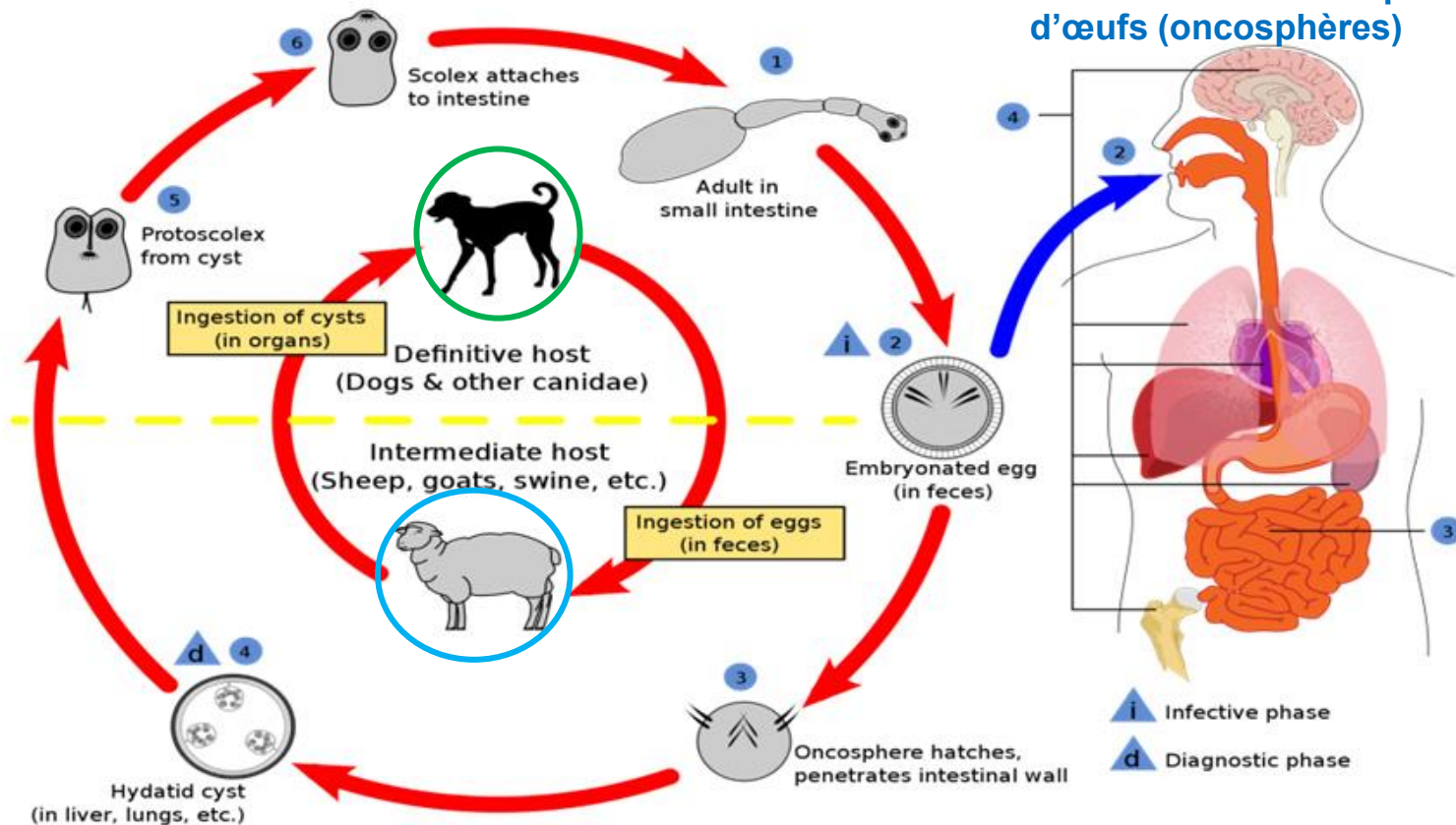
❑ Développement asymptomatique et lent de l'EK : détection fortuite +++

❑ Zoonose cosmopolite : 20 maladies négligées prioritaires de l'OMS feuille de route stratégique pour 2020-2030



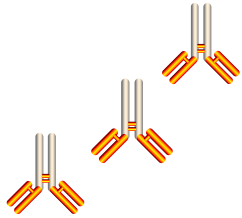
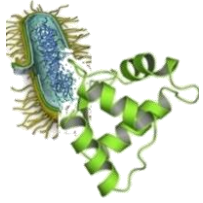
Chahed et al., 2015

Infestation humaine accidentelle par ingestion d'œufs (oncosphères)



Cycle évolutif du parasite (dixène)

Suivi sérologique post-opératoire de l'EK

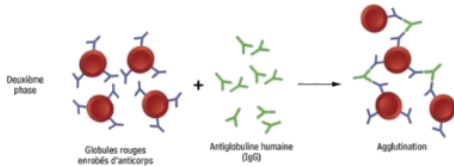


Sources antigéniques !

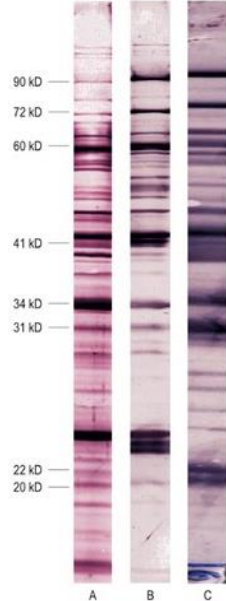
- **Ag natif du LH et dérivés de l'Ag B** : Longue persistance des Ac anti-LH chez les patients guéris 😞
- **Ag Recombinants** : Faible sensibilité (patients avec kystes inactifs ...)



ELISA



Hémagglutination indirecte



Western Blot

(Hernandez-Gonzalez et al., 2018)

(Sarkari et al., 2015, Gonzalez et al., 2003)

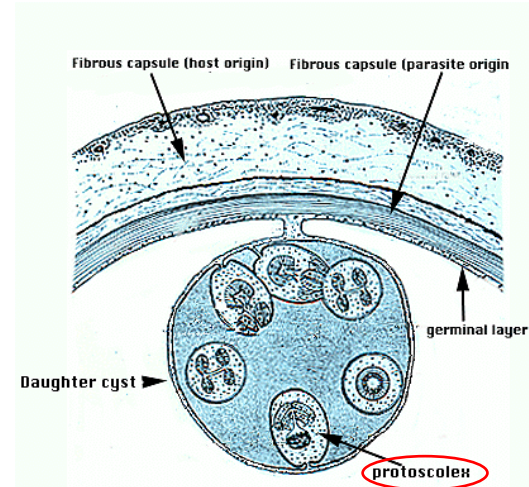
- ❑ Suivi post-opératoire de l'EK : **Taux élevé** de **récidives** suite au déversement péri-chirurgical accidentel du matériel parasitaire (**protoscolex +++**)

➔ **Echinococcose secondaire**

- ❑ Développement lent et silencieux de l'EK
- ❑ Performance limitée des tests sérologiques et radiologiques

➔ récidives sont souvent découverts tardivement : suivi des patients EK difficile

➔ **un véritable challenge pour les cliniciens!**



Nécessité des nouveaux biomarqueurs précoces

Ag du protoscolex : Alternative intéressante?

Extrait des protocoles: P-29

Isolation and molecular characterization of recombinant *Echinococcus granulosus* P29 protein (recP29) and its assessment for the post-surgical serological follow-up of human cystic echinococcosis in young patients

Nadia Ben Nour^{a,b}, Christian Gianinazzi^b, Mohamed Gorcii^a,
Norbert Müller^b, Abdellatif Nouri^c, Hamouda Babba^a, Bruno Gottstein^{b,*}

^a University of Monastir, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Biology B, Laboratory of Parasitology and Mycology, 99UR/08-05 1-rue avicenne, 5000 Monastir, Tunisia

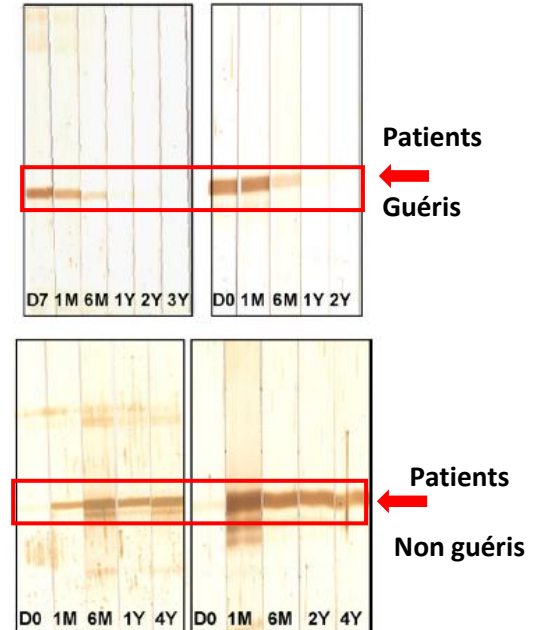
^b Institute of Parasitology, University of Bern, Laengasstrasse 122, CH-3012 Bern, Switzerland

^c E.P.S. Fattouma Bourguiba, Pediatric Surgery Service, 5000 Monastir, Tunisia

Received 28 May 2008; received in revised form 30 September 2008; accepted 30 September 2008

Available online 21 November 2008

Marqueur protéique précoce de guérison



Ac anti-rP-29 disparaissent à partir de 3 années en post-opératoire

Follow-up of surgically treated patients with cystic echinococcosis: can novel recombinant antigens compete with imaging? Analysis of a patient cohort

Marija Stojkovic¹, Hans-Micha Adt¹, Kerstin Rosenberger¹, Ghalia Boubaker^{2,3,4}, Ana Hernandez-Gonzalez⁵, Thomas Junghanss¹, Marcel Zwahlen⁶ and Mar Siles-Lucas⁵

1 Section Clinical Tropical Medicine, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

2 Institute of Parasitology, University of Bern, Bern, Switzerland

3 Graduate School for Cellular and Biomedical Sciences, University of Bern, Bern, Switzerland

4 Department of Clinical Biology B, Laboratory of Parasitology and Mycology, University of Monastir, Monastir, Tunisia

5 Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Salamanca, Spain

6 Institute of Social and Preventive Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

Abstract

OBJECTIVE To compare the performance of two novel recombinant antigens (EgP29, 2B2t) with imaging in a well-defined cohort of surgically treated cystic echinococcosis (CE) patients to determine whether serology reflects surgical cure as defined by imaging.

METHODS From a cohort of 223 CE-confirmed patients of a national clinical center for echinococcosis, 36 surgically treated patients were eligible for analysis. Sera were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for specific IgG and IgG4 antibodies against the EgP29 and 2B2t antigens. We used a hierarchical linear regression model to examine the course of antibody levels over time for each patient. A meta-analysis of the patient-specific estimates of the time to negativity was performed using the metan command in Stata.

RESULTS The range of positive serological results at the beginning of post-surgical monitoring was 34–60%: 2B2t 51%, 2B2t-IgG4 34%, EgP29 60% and EgP29-IgG4 40%. The pooled estimates of time to seronegativity were as follows: 2B2t-ELISA 3.92 (3.24, 4.61) years; 2B2t-IgG4-ELISA 4.60 (3.91, 5.29) years; EgP29-ELISA 3.94 (3.50, 4.39) years; EgP29-IgG4-ELISA 2.55 (1.93, 3.18) years.

CONCLUSION After surgical treatment, antibodies to the recombinant antigens 2B2t and EgP29 become negative in the majority of CE-confirmed, surgically cured patients. The major drawback is the fact that only around half of the CE-confirmed, surgically treated patients were at all responsive to the test antigens, so they are of limited benefit for documenting primary cure. Equally, these antigens do not appear to be sensitive to recurrences.

Ac anti rP29 : séronégatifs chez la moitié des patients EK

Analyse comparative de toutes les protéines immunoréactives d'*E. granulosus* Identification et évaluation des nouveaux biomarqueurs précoces pour le suivi post-chirurgical de l'EK

Journal of Infection 84 (2022) 87–93



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Infection **IF: 6, 072 /Q1**

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jinf



Novel biomarkers for the early prediction of pediatric cystic echinococcosis post-surgical outcomes



Eya Ben Salah^{a,b,c}, Coralie Barrera^{b,c}, Wahiba Sakly^a, Sana Mosbahi^d, Thierry Balliau^e,
Nathalie Franche^c, Bruno Gottstein^f, Sabine Ben Youssef^d, Mongi Mekki^d,
Hamouda Babba^a, Laurence Millon^{b,c,*}

^a Département de Biologie clinique B, Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie Médicale et Moléculaire LR12ES08, Université de Monastir, Monastir, Tunisia

^b National French Reference Centre for Echinococcosis, University Hospital, University Bourgogne Franche-Comté, Bd Fleming, Besançon F-25000, France

^c Department of Parasitology Mycology, University Hospital of Besançon, UMR/ CNRS 6249 Chrono-Environnement Research Team, University of Bourgogne, Franche-Comté, France

^d Paediatric Surgery Department, Laboratory of Malformative and Tumor Pathology in Children (LR12SP13), Medical School, Fattouma Bourguiba University Hospital, Monastir, Tunisia

^e PAPPSSO, INRAE, CNRS, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, GQE-Le Moulon, Gif-sur-Yvette 91190, France

^f Institute for Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

Approche protéomique d'Immunoprécipitation (IP) : comparaison de l'abondance des protéines immunoréactives des extraits des protoscolex (PSMA) dans les éluats de 5 NRCE versus 5 RCE 1M vs 1A

2 CE-pediatric groups

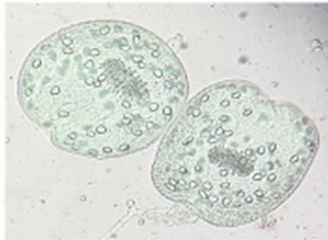


Surgery

2 Plasmas /child { 1-Month
1-year

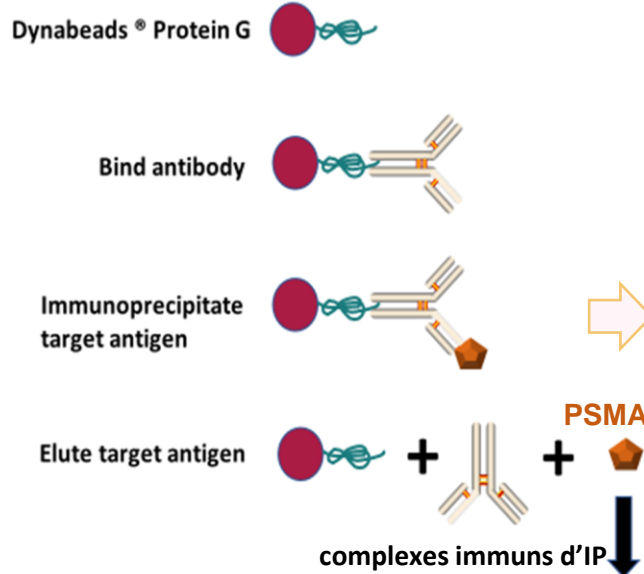


Antigens: Protoscolex Proteins

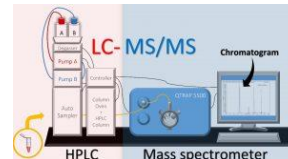


PSMA

Immunoprecipitation

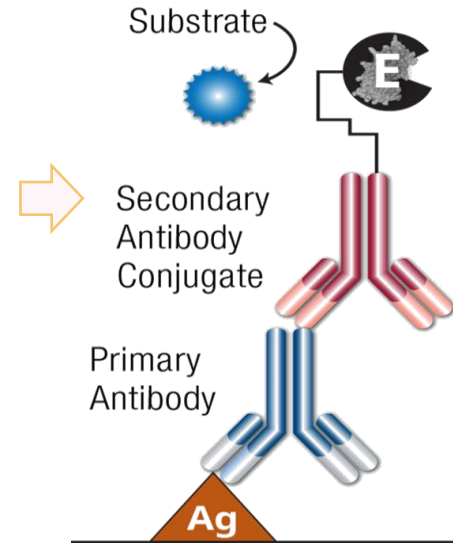


Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)
Plateforme PAPPSSO (Paris, France)

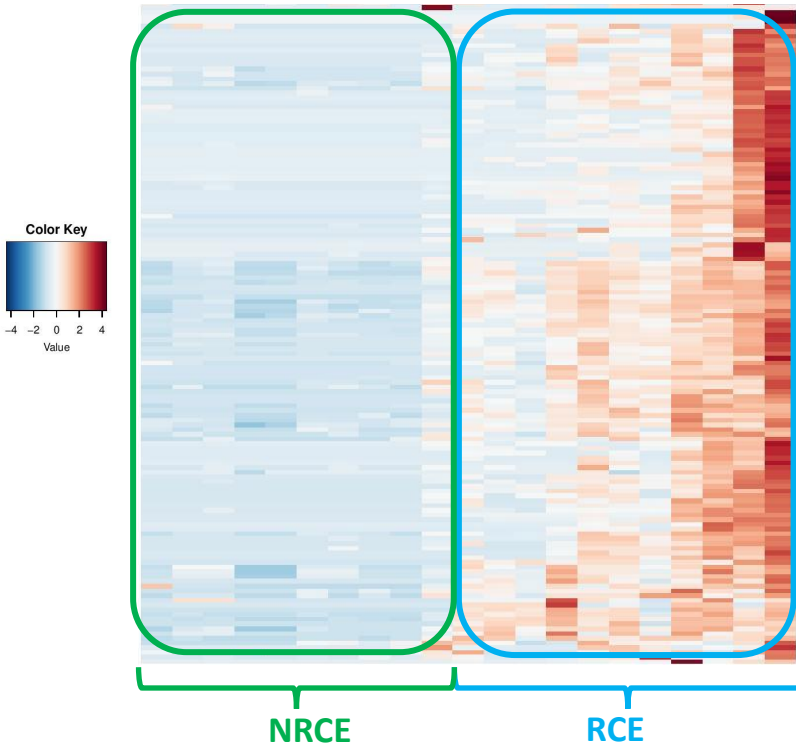


Sélection des biomarqueurs précoces de développement clinique post-opératoire de l'EK

ELISA indirecte



Les protéines parasitaires identifiées (305)



Heatmap des Protéines immunoréactives d'*E. granulosus*

4 marqueurs sélectionnés

IgG antibody response against	Probability of being “relapse free” at 1Y
Eg-cMalate dehydrogenase	83%
Eg-Citrate synthase	81%
Eg-Annexin A6	71%
Eg-Severin	72%

La Eg-cMalate déshydrogenase et la Eg-Citrate synthase :
meilleurs prédicteurs précoces du développement
clinique post-opératoire de l'EK

Les protéines ont été **significativement plus abondantes** chez les patients **RCE** en comparaison aux **NRCE** dans les éluats de 1M et 1A

Objectifs

- Évaluer l'abondance des protéines immunoréactives du plasma, comparativement chez les enfants récidivants (RCE) pour l'EK versus les non-récidivants (NRCE) après traitement chirurgical
- Identifier de nouveaux biomarqueurs précoces pour un meilleur suivi de l'EK

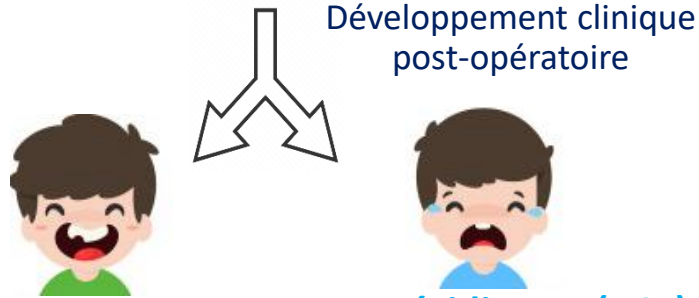


Réduction de la période de suivi

Matériel & Méthodes

Patients

- **Etude prospective** : 10 enfants traités chirurgicalement pour l'EK
- Suivis pendant **4 ans** post-opératoires



Non-récidivants (NRCE)
jusqu'à 4 ans post-opératoires
n = 5

Récidivants (RCE)
ayant développé des récidives au cours la 1^{ère} année post-opératoire
n = 5

Service de Chirurgie Pédiatrique,
CHU Fattouma Bourguiba, Monastir



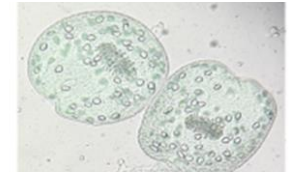
* **20 échantillons de plasmas**

Intervention chirurgicale



* **Groupe contrôle**

* **Sources antigéniques**
Protéines de protoscolex

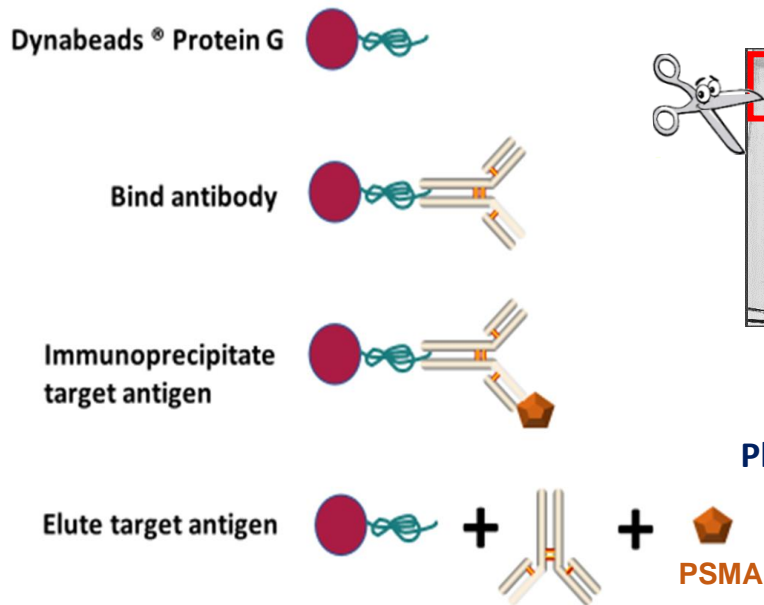


Foies ovins parasités par *E. granulosus*

- **Approbation éthique** : Acceptance Report IORG 0009738 N°22/OMB 0990-0279 par le comité d'éthique de la Faculté de Médecine de Monastir

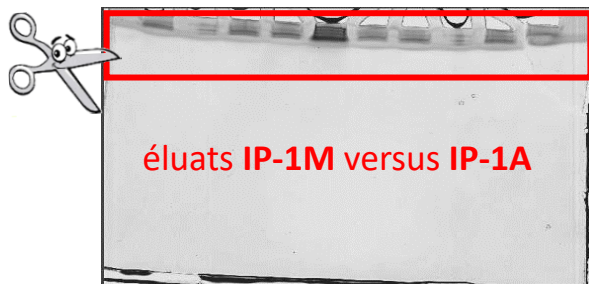
Méthodes

Immunoprecipitation

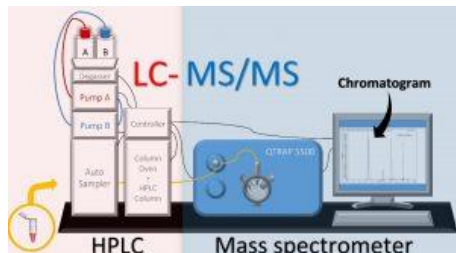


Chromatographie en phase liquide
couplée à la spectrométrie de masse
en tandem (LC-MS/MS)

Pré-migration des complexes immuns d'IP 1M et 1A



Analyse des bandes protéiques
Plateforme PAPPISO (Paris, France)



- Analyse quantitative et qualitative des protéines immunoréactives : **heatmap**
- L'abondance des protéines a été estimée en nombre de spectres de MS/MS
- Clusters des protéines : abondance dans les éluats IP des patients « **récidivants** » versus « **non-récidivants** »



Méthodes

Critères de sélection des protéines

Les protéines sont regroupées en clusters selon leurs abondance chez les "RCE" versus "NRCE" à 1 mois versus 1 an post-opératoire

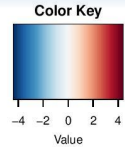
Les protéines avec $SC > 20$ au moins dans un éluât d'IP

Les protéines avec $SC < 5$ dans l'éluat IP des contrôles

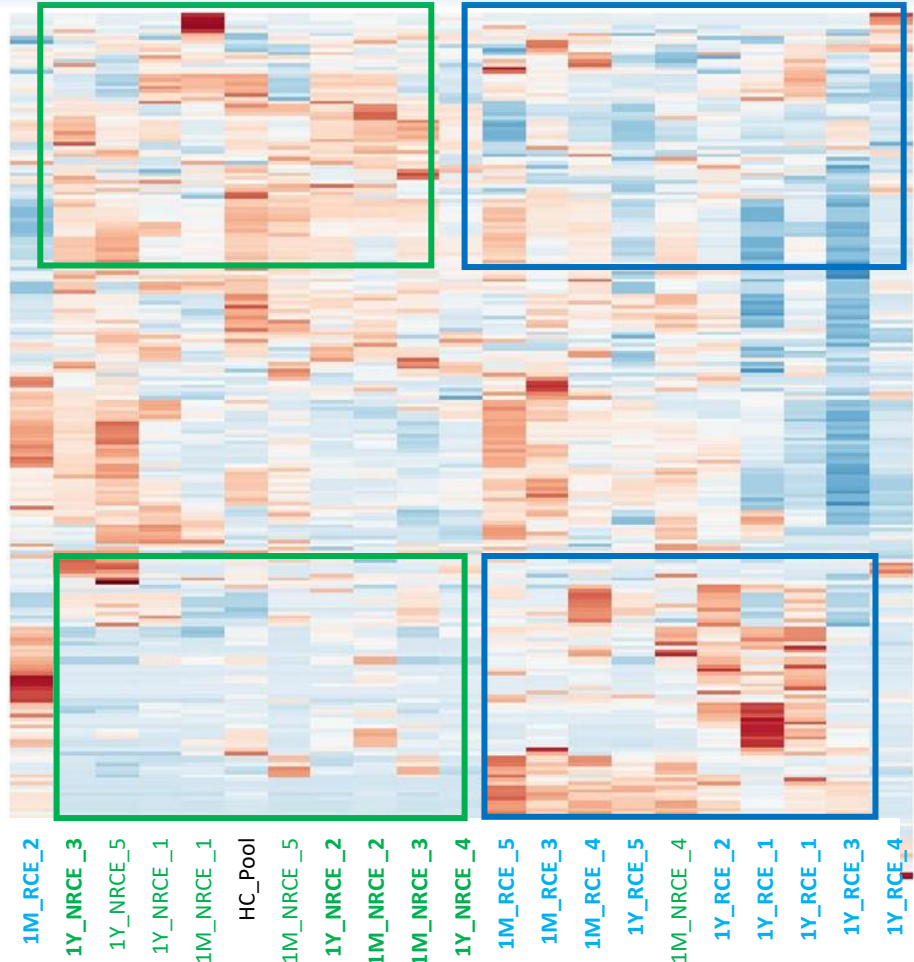
Les protéines avec $SC > 5$ dans tous les éluats IP-1 A des RCE

SC : Le nombre de spectre de spectrométrie de masse

Résultats

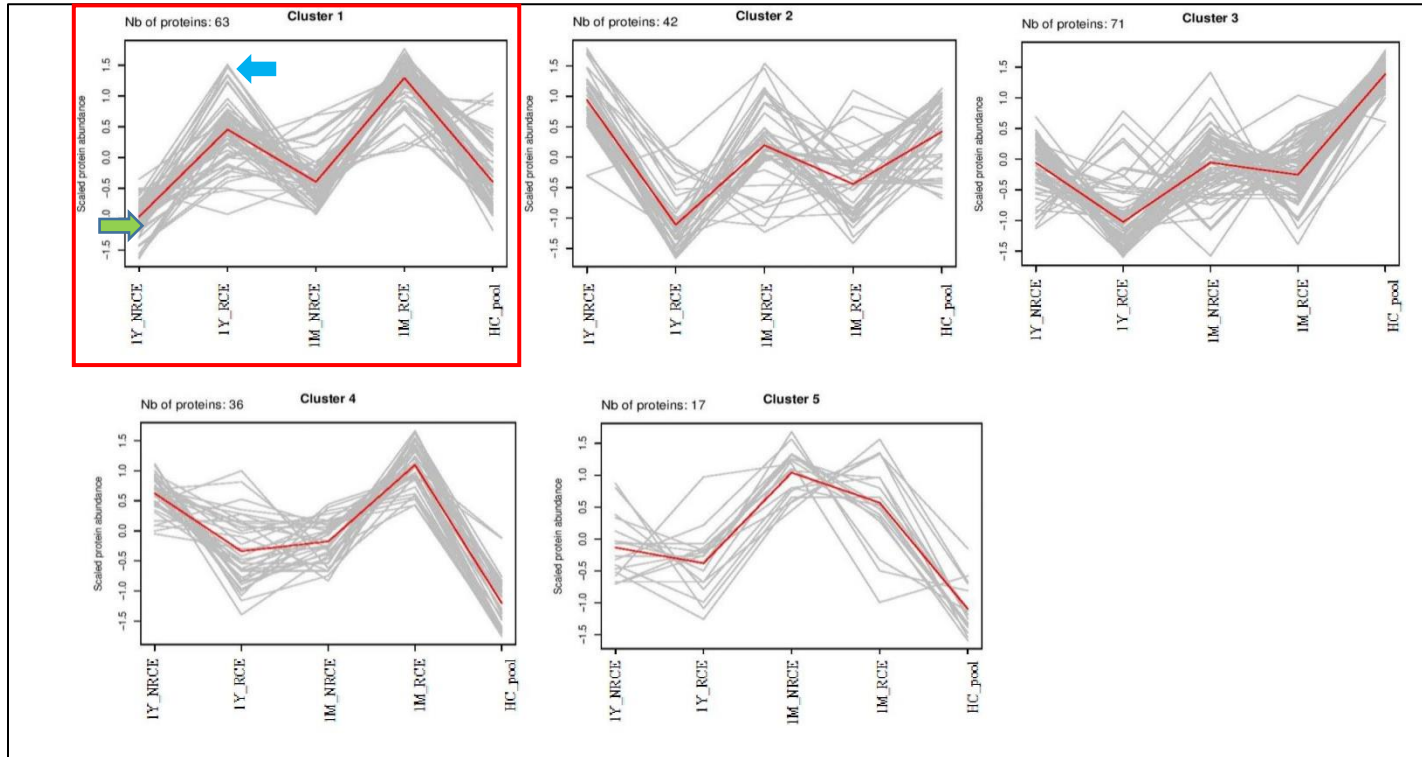


- Identification de 688 protéines immunoréactives humaines de plasma
- Les protéines sont **qualitativement** et **quantitativement** inégalement réparties entre les deux groupes de patients
- Certaines protéines ont été significativement plus abondantes chez les patients **RCE** en comparaison aux **NRCE** dans les éluats de 1M et 1A
- D'autres protéines ont montré une **tendance inverse**



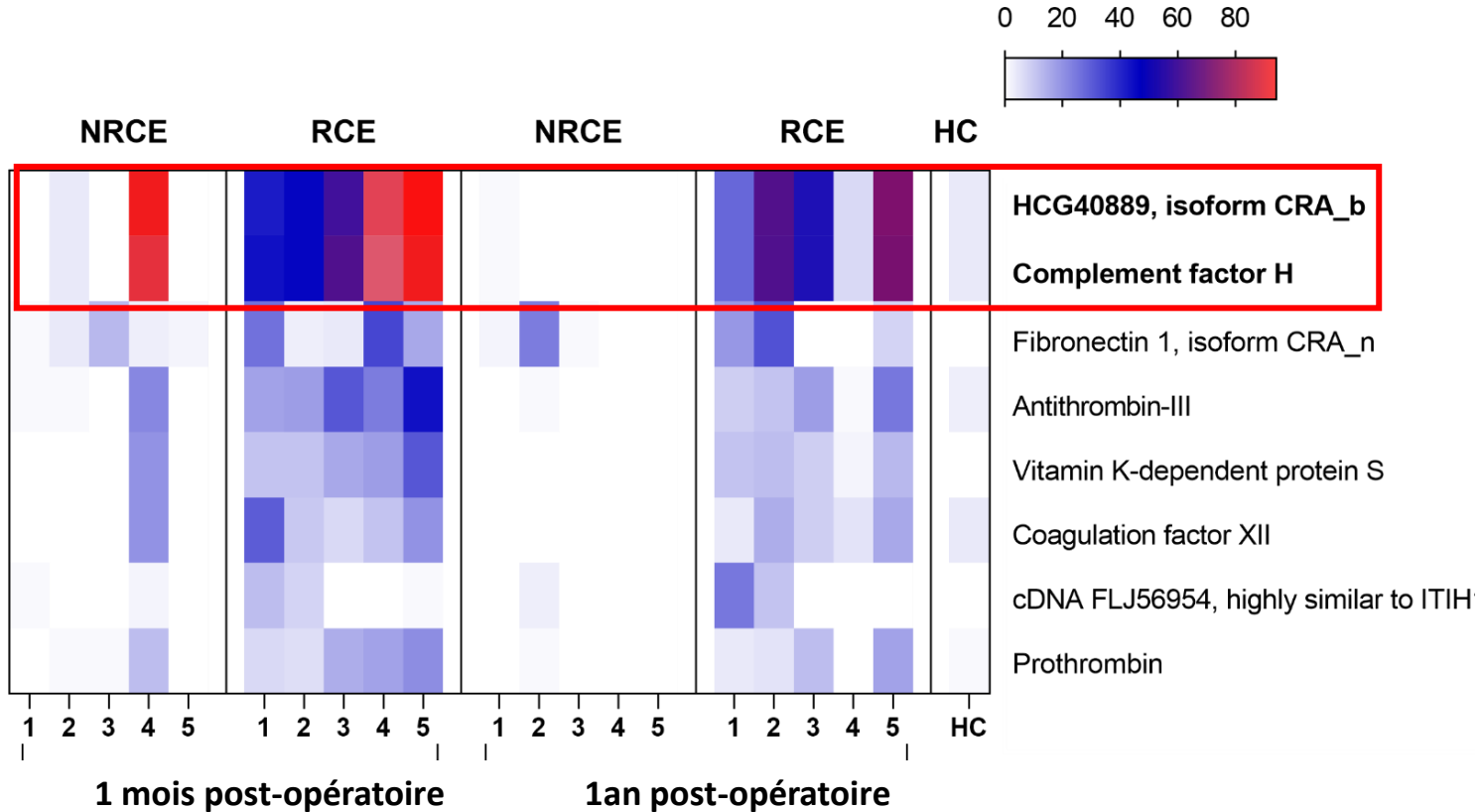
Résultats

5 clusters des protéines les plus abondantes (n = 229)



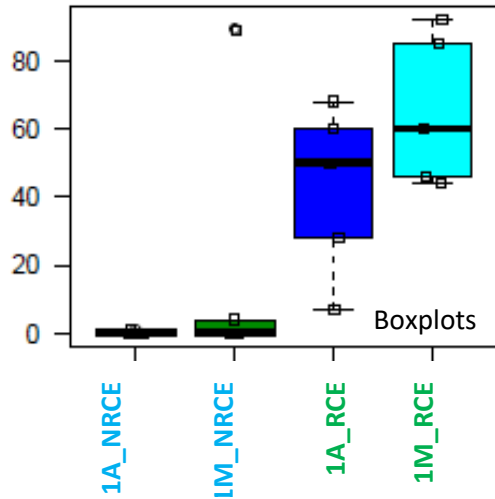
Résultats

2 protéines prometteuses



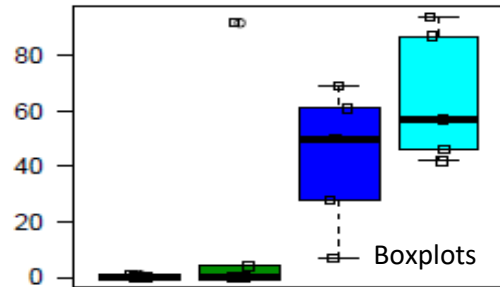
Résultats et discussion

Complement factor H



- Glycoprotéine qui joue un rôle essentiel dans les réponses immunes
- Régulateur majeur de l'activation du système complément
- Agit comme un inhibiteur soluble du complément

Rôle de ces deux molécules dans l'immunopathologie de l'EK?



- Protéine impliquée dans de nombreux processus de reconnaissance et dans la liaison de plusieurs facteurs du complément aux fractions C3b et C4b

HCG40889, isoform CRA_b

Conclusions & perspectives

- Première étude du genre à montrer des différences **quantitatives** et **qualitatives** des **protéines immunoréactives humaines** entre les patients EK “**récidivants**” versus “**non-récidivants**”
- Les protéines identifiées pourraient servir de prédicteurs précoces du développement clinique post-opératoire de l'EK (**spécificité??**)
- Doser le facteur H du complément dans les plasmas des patients EK par ELISA → une potentielle valeur pronostique ?



Merci de votre attention

LP3M Laboratoire
Parasitologie Mycologie
Médicale & Moléculaire



CNR Echynococcoses

CHRONO
ENVIRONNEMENT



UNIVERSITÉ de
FRANCHE-COMTÉ



كلية الطب بالمنستير
FACULTÉ
DE Médecine
DE MONASTIR

LR12
SP13



u^b

^b
UNIVERSITÄT
BERN

