

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
BAB EZZOUAR
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de DOCTEUR EN SCIENCES

En: Sciences BIOLOGIQUES

Spécialité: **Biochimie-Immunologie**

Par: M^{me} BOUTELDJA RAZIKA

THÈME

Étude des effets du monoxyde d'azote *in vivo*, *in vitro* et *in situ* au cours des localisations fréquentes et rares de l'hydatidose: Apport de l'analyse protéomique du liquide hydatique

Soutenue publiquement le 12 / 04 / 2018, devant le jury composé de :

M ^{me} LARABA-DJEBARI F.	Professeur, à l'USTHB	Présidente
M ^{me} TOUIL-BOUKOFFA C.	Professeur, à l'USTHB	Directrice de thèse
M ^{me} DJERDJOURI B.	Professeur, à l'USTHB	Examinatrice
M. DJENOUHAT K.	Professeur, à l'EPH-ROUIBA	Examineur
M. HAMRIOUI B.	Professeur, au CHU Mustapha Bacha	Examineur
M ^{lle} AMRI M.	Maitre de conférences/A, à l'USTHB	Examinatrice

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DES SCIENCES ET DE LA TECHNOLOGIE HOUARI BOUMEDIENE
BAB EZZOUAR
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES



THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de DOCTEUR EN SCIENCES

En: Sciences BIOLOGIQUES

Spécialité: **Biochimie-Immunologie**

par : M^{me} BOUTELDJA RAZIKA

THÈME

Étude des effets du monoxyde d'azote *in vivo*, *in vitro* et *in situ* au cours des localisations fréquentes et rares de l'hydatidose: Apport de l'analyse protéomique du liquide hydatique

Soutenue publiquement le 12 /04 / 2018, devant le jury composé de :

M ^{me} LARABA-DJEBARI F.	Professeur, à l'USTHB	Présidente
M ^{me} TOUIL-BOUKOFFA C.	Professeur, à l'USTHB	Directrice de thèse
M ^{me} DJERDJOURI B.	Professeur, à l'USTHB	Examinatrice
M. DJENOUHAT K.	Professeur, à l'EPH-ROUIBA	Examineur
M. HAMRIOUI B.	Professeur, au CHU Mustapha Bacha	Examineur
M ^{lle} AMRI M.	Maitre de conférences/A, à l'USTHB	Examinatrice

Remerciements

J'exprime ma profonde reconnaissance et mes vifs remerciements à **Madame C.Touil-Boukoffa**, Professeur et directrice du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire à la FSB-USTHB, pour sa bienveillance, sa rigueur scientifique et ses conseils judicieux qu'elle n'a cessé de me les prodiguer et qui a été pour moi un soutien important. Merci pour tous vos conseils avisés. Veuillez trouver, ici, le témoignage de mon estime et de ma sincère gratitude.

Je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer mes travaux, vos remarques pertinentes nous permettrons d'améliorer les perspectives de ce travail:

Pr Laraba-Djebari. F. Professeur et Doyenne de la Faculté des Sciences Biologiques pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury malgré les nombreuses tâches scientifiques et administratives qui lui incombent. Mes plus sincères remerciements pour vos qualités d'enseignante-chercheur, vos encouragements, votre soutien et votre gentillesse. Je vous suis infiniment reconnaissante

Pr Djerdjouri B. Professeur à la Faculté des Sciences Biologiques pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer le plaisir de la voir participer à mon jury et ma gratitude pour la qualité de l'enseignement qu'elle m'a prodiguée.

Dr. Amri M. Maître de conférences à la Faculté des Sciences Biologiques pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer le plaisir de la voir participer à mon jury.

Pr. Hamrioui B. Professeur au CHU de Mustapha Bacha pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je tiens également à le remercier vivement pour son étroite collaboration. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère considération

Pr. Djenouhat K. pour l'honneur qu'il m'a fait en acceptant d'examiner ce travail. Je tiens à lui exprimer le plaisir de le voir participer à mon jury.

À toute l'équipe du laboratoire de biologie cellulaire et moléculaire et particulièrement l'équipe Cytokines et NO Synthèses/Immunité et Pathogénie.

Nos remerciements s'adressent également au **Professeur Chaouche H.**, chef de service chirurgie thoracique au CHU Mustapha Bacha, **M. Belkacem et Souhila** chef du bloc opératoire du service de chirurgie thoracique hôpital Mustapha Bacha.

Je tiens à remercier chaleureusement **le Docteur. Bousbata Sabrina**, directrice de la plateforme de protéomique au laboratoire de microbiologie, qui a été toujours disponible pendant mon stage à l'institut de biologie et de médecine moléculaire (IBMM), Belgique.

J'adresse également mes remerciements à **M. Andy Polomé** qui a été toujours disponible pour me guider dans mes analyses. À **M^{me} Pascale Van Vooren** technicienne au laboratoire du transport membranaire à l'IBMM.

Mes remerciements vont également au professeur **Etienne Pays** celui qui a découvert le mécanisme d'échappement de *trypanosoma* au système immunitaire, je le remercie pour ses conseils et sa rigueur scientifique ainsi qu'à toute l'équipe de parasitologie moléculaire pour leur sympathie **Lowrance, Luck, Patricia et Pyas**.

J'adresse mes remerciements tout particulièrement au professeur **Bruno Gottstein**, et **M^{me} Dominique A. Vuitton** d'avoir prêté un intérêt particulier à nos travaux de recherche ainsi qu'aux membres de l'organisation mondiale de la santé.

J'adresse mes remerciements les plus chaleureux aux malades pour leur coopération en leur souhaitant un prompt rétablissement, au personnel paramédical et biologistes des différents services hospitaliers d'Alger pour leur aide précieuse.

Mes sincères remerciements à mes parents à qui je dois d'en être arrivée là.

J'aimerais remercier du fond du cœur ceux qui, par leur compétence et encouragement ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

J'adresse une pensée toute particulière au regretté le **Professeur Ayad G.** en neurobiologie de qui j'avais une si grande estime.

Dédicaces

Je dédie ce travail

À la mémoire de mon très cher père, ton amour, ton affection et ton soutien ne m'ont jamais fait défaut, tu as toujours consenti d'énormes sacrifices pour mon bien-être et mon éducation jusqu'au dernier souffle de ta vie

À ma très chère maman pour son soutien et patience

À mes frères Samir et Rafik

À ma sœur Doria-Férial

À mes petits anges Kamelia-Lina, Yacine, Yasmine et Lilya

À mon compagnon de vie Azedine pour son soutien et patience

À ma meilleure amie Sihem

À toute ma famille et mes amis qui m'ont soutenue tout au long de mes études.

Razika



SOMMAIRE

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....	1
I.REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	
1. L'échinococcose kystique.....	3
I.1. Définition.....	3
I.1.2. Aperçu historique.....	3
I.1.3. La classification d'<i>E. granulosus</i>.....	3
I.1.4. Epidémiologie de l'hydatidose.....	6
<i>I.1.4.1. Dans le monde.....</i>	6
<i>I.1.4.2. En Algérie.....</i>	6
<i>I.1.4.3. Epidémiologie des souches d'<i>E. granulosus</i>.....</i>	7
I.1.5. Le cycle de vie d'<i>E. granulosus</i>.....	8
I.1.6. Description des formes parasitaire d'<i>E. granulosus</i>.....	9
<i>I.1.6.1. Le ver adulte.....</i>	9
<i>I.1.6.2. Les œufs.....</i>	10
<i>I.1.6.3. Le metacestode (la larve hydatique).....</i>	10
<i>I.1.6.3.1. L'adventice.....</i>	11
<i>I.1.6.3.2. La couche laminaire externe ou cuticule.....</i>	11
<i>I.1.6.3.3. La membrane germinative interne ou proligère.....</i>	12
<i>I.1.6.3.4. La fertilité de l'hydatide.....</i>	13
<i>I.1.6.3.5. Le liquide hydatique.....</i>	13
<i>I.1.6.3.6. Le protoscolex.....</i>	14
I.1.7. La spécifié de l'hôte.....	14
<i>I.1.7.1. La spécificité de la forme adulte.....</i>	14
<i>I.1.7.2. Spécificité de la forme larvaire.....</i>	14
I.1.8. Les caractéristiques cliniques de l'hydatidose.....	15
<i>I.1.8.1. Les symptômes de l'hydatidose.....</i>	15
<i>I.1.8.2. Les localisations du kyste hydatique.....</i>	15
I.1.9. Les méthodes de diagnostic.....	16
<i>I.1.9.1. Le diagnostic radiologique.....</i>	16
<i>I.1.9.2. Le diagnostic biologique.....</i>	17

I.1.10. Le traitement de l'hydatidose.....	17
I.1.11. La vaccination.....	18
<i>I.1.11.1. Chez l'hôte intermédiaire.....</i>	<i>18</i>
<i>I.1.11.2. Chez l'hôte définitif.....</i>	<i>18</i>
I.1.12. Les stratégies de lutte et de prévention contre l'hydatidose.....	18
I.1.13. Le génome d'<i>E. granulosus</i> et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.....	18
I.1.14. L'immunopathologie de l'infection parasitaire par <i>E. granulosus</i>.....	19
<i>I.1.14.1. Impact de la relation hôte/<i>E. granulosus</i> sur l'établissement de la parasitose.....</i>	<i>19</i>
<i>I.1.14.2. Le pouvoir antigénique de l'hydatide.....</i>	<i>20</i>
<i>I.1.14.3. La réponse immunitaire vis-à-vis d'<i>E. granulosus</i>.....</i>	<i>21</i>
I.2. Le monoxyde d'azote	
I.2.1. Les propriétés physico-chimiques du monoxyde d'azote.....	25
I.2.2. La biosynthèse du NO.....	25
<i>I.2.2.1. Structure des NOSynthases.....</i>	<i>25</i>
<i>I.2.2.2. Le mécanisme catalytique de la biosynthèse du NO.....</i>	<i>26</i>
I.2.3. Les isoformes des NOSynthases.....	28
<i>I.2.3.1. La NO synthase neuronale (NOS1).....</i>	<i>28</i>
<i>I.2.3.2. La NO synthase inductible (NOS2).....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.3.3. La NO synthase endothéliale (NOS3).....</i>	<i>29</i>
<i>I.2.3.4. Les NOSynthases mitochondriales (mit NOS).....</i>	<i>29</i>
I.2.4. Régulation de l'expression et de l'activité des NOSynthases.....	30
I.2.5. Le rôle physiologique du monoxyde d'azote.....	31
I.2.6. Le rôle du NO dans la réponse immuno-inflammatoire.....	32
I.2.7. La cytotoxicité du monoxyde d'azote.....	34
I.2.8. Le rôle du monoxyde d'azote dans la physiopathologie.....	35
I.2.9. Le rôle du monoxyde d'azote dans la défense antiparasitaire.....	35
I.2.10. Les mécanismes d'évasion déployés par les parasites vis-à-vis du NO.....	36
I.3.3. Apport de la protéomique	
I.3.1. Les outils de l'analyse protéomique.....	37
<i>I.3.1.1. La recherche des protéines d'intérêt par analyse d'image.....</i>	<i>37</i>
<i>I.3.1.2. Identification des protéines par spectrométrie de masse(SM).....</i>	<i>38</i>

<i>I.3.1.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)</i>	39
<i>I.3.1.4. Interrogation des bases de données</i>	41
I.3.2. Intérêt de la bioinformatique dans l'analyse protéomique	41
I.3.3. Les domaines d'applications de la protéomique.....	41
I.3.4. Intérêt de l'analyse protéomique dans l'étude de l'échinococcose kystique	42

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II. 1. Le matériel biologique	44
<i>II.1.1. Les patients</i>	44
<i>II.1.2. Le sang</i>	45
<i>II.1.3. Les kystes hydatiques</i>	45
<i>II.1.4. Les liquides hydatiques</i>	45
<i>II.1.5. Les biopsies</i>	46
<i>II.1.6. La Souche bactérienne Pseudomonas oleovorans ATCC 8062</i>	46
II. 2. Le matériel non biologique	46
II.3. Méthodes et techniques d'analyse	47
II.3.1. Examen de fertilité des liquides hydatiques	47
II.3.2. Test de viabilité des protoscolex	47
II.3.3. Dosage des nitrites par la méthode de GRIESS Modifiée	49
II.3.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford	49
II.3.5. Extraction des protéines	49
<i>II.3.5.1. Préparation de l'extrait protéique du liquide hydatique</i>	49
<i>II.3.5.2. Extraction des protéines solubles à partir des protoscolex</i>	50
<i>II.3.5.3. Extraction des protéines solubles à partir de la couche laminaire</i>	50
II.3.6. Analyse protéomique et identification des protéines exprimées au niveau de la larve hydatique	50
II.3.6.1. Dosage des protéines par la méthode de Pearce 660	51
II.3.6.2. Les méthodes de séparation des protéines	51
II.3.6.2.1. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE)	51
<i>a. L'isoélectrofocalisation (IEF) par le système Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System</i>	51
<i>b. Application du SDS-PAGE</i>	53
<i>c. Visualisation des gels</i>	54

II.3.6.2.2. La digestion enzymatique des protéines au niveau du gel.....	54
II.3.6.2.3. Extraction des fragments peptidiques à partir du gel	54
II.3.6.2.4. Analyse LC-MS/MS.....	55
II.3.6.2.5. Analyse bioinformatique.....	56
II.3.7. Identification des épitopes sur la base de l'immunome d' <i>E. granulosus</i>	57
II.3.8. L'électrophorèse bidimensionnelle différentielle DIGE (Différentiel gel electrophoresis).....	58
II.3.9. La coloration au nitrate d'argent.....	59
II.3.10. Le « Western blot ».....	59
II.3.11. Recherche <i>in silico</i> d'une NOS putative au niveau d' <i>E. granulosus</i>	60
II.3.12. Mise en évidence de la production <i>in vitro</i> du NO par les protoscolex.....	60
II.3.13. Étude histologique d'une biopsie de poumon.....	60
II.3.14. Synthèse du peroxy-nitrite par la méthode du «quench flow».....	61
II.3.15. Étude de l'effet <i>in vitro</i> des métabolites de NO (nitrites, nitrates et peroxy-nitrite)	62
II.4. Analyse statistique.....	62

III. RÉSULTATS

III.1. Étude de la production systémique du NO.....	63
III.2. Production de NO dans les liquides hydatiques.....	63
III.3. Dosage des protéines dans les liquides hydatiques.....	65
III.4. Analyse protéomique relative au stade larvaire d' <i>E. granulosus</i>	67
<i>III.4.1. Profil de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) de l'extrait protéique du liquide hydatique</i>	67
<i>III.4.2. Le profil protéique des liquides hydatiques sur SDS-PAGE</i>	69
<i>III.4.3. Analyse fonctionnelle des protéines putatives exprimées dans les liquides hydatiques selon leur localisation</i>	69
<i>III.4.3.1. Identification des protéines putatives au niveau des liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV)</i>	71
<i>III.4.3.2. Analyse bioinformatique</i>	71
<i>i. Identification des protéines d'origine humaine de l'hôte</i>	71
<i>ii. Identification des protéines parasitaires</i>	75
<i>III.4.3.3. Comparaison de la composition antigénique des liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV)</i>	80

<i>III.4.3.4. Identification des antigènes (épitopes) importants d'E.granulosus</i>	81
III.5. Étude comparative du profil d'expression des protéines exprimées par les protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques de différentes localisations	83
<i>III.5.1. Application de la 2DE à l'extrait protéique de protoscolex</i>	83
<i>III.5.2. Étude de la variabilité protéique d'extraits de protoscolex d'Echinococcus granulosus</i>	84
<i>III.5.3. Étude de la variabilité protéique de deux extraits solubles de protoscolex selon la localisation kystique</i>	86
III.6. Caractérisation protéomique de la couche laminaire	88
III.7. Étude comparative de l'antigénicité de la couche laminaire hydatique	89
<i>III.7.1. Profil SDS-PAGE de L'extrait protéique de couches laminaire de différentes localisations</i>	90
<i>III.7.2. Comparaison de l'antigénicité de la couche laminaire selon la localisation et la fertilité</i>	90
III.8. Recherche <i>in silico</i> d'une NOS putative	93
III.9. Étude histopathologique d'une biopsie du poumon affecté par un kyste hydatique	96
III.10. Étude de l'effet <i>in vitro</i> des métabolites du NO (nitrite, nitrate et peroxy-nitrite) .96	
<i>III.10.1. Étude de l'effet scolicide des métabolites de NO in vitro</i>	96
<i>III.12.2. Étude de l'effet des métabolites du NO sur les membranes kystiques</i>	100
IV. DISCUSSION	104
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES	114
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
RÉSUMÉ	

**LISTE
DES
FIGURES**

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Répartition géographique de l'échinococcose kystique dans le monde.....	6
Figure 2: Morphologie du ver adulte d' <i>E. granulosus</i> de 35 jours.....	7
Figure 3: Le cycle évolutif basique d' <i>E. granulosus</i>	8
Figure 4: Morphologie du ver adulte d' <i>E. granulosus</i>	9
Figure 5: Schéma d'un œuf d' <i>E. granulosus</i>	10
Figure 6: Structure du kyste hydatique.....	11
Figure 7: Structure de la couche laminaire.....	12
Figure 8: Structure des NOSynthases.....	26
Figure 9: Les réactions de la synthèse du monoxyde d'azote.....	27
Figure 10: Le mécanisme catalytique des NOSynthases	28
Figure 11: Implication de la NADPH oxydase et la NOSynthase dans la formation du peroxynitrite.....	33
Figure 12: Le monoxyde d'azote et ses dérivés.....	34
Figure 13: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.....	39
Figure 14: Stratégie générale de l'analyse nano LC-MS/MS.....	40
Figure 15: Démarche expérimentale	48
Figure 16: Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE).....	52
Figure 17: Fenêtre des différents paramètres du logiciel MASCOT®.....	56
Figure 18: Fenêtre du système de classification des protéines PANTHER®.....	57
Figure 19: Les informations relatives à la base de données des épitopes d' <i>E. granulosus</i>	58
Figure 20: Protocole de synthèse du peroxynitrite par la méthode du « quench flow ».....	61
Figure 21: Variation des teneurs en nitrites détectés dans les sérums de patients hydatiques.	64
Figure 22: Comparaison des taux de nitrites dans les liquides hydatiques pulmonaires selon leur de gré de fertilité.....	66
Figure 23: Taux de protéines dans les liquides hydatiques hépatiques et pulmonaires selon leur fertilité.....	66
Figure 24: Gel 2-DE représentatif de l'extrait protéique marqué au Cy5 d'un liquide hydatique pulmonaire.....	68
Figure 25: Gel SDS - PAGE des protéines extraites du liquide hydatique humain (20 µg) après coloration avec le bleu de Coomassie.....	70
Figure 26: Diagramme de Venn représentant la répartition des protéines de l'hôte identifiées dans les liquides hydatiques (LHP, LHV et LHPV).....	75

Figure 27: Diagramme de Venn représentant la répartition des protéines parasitaires identifiées dans les liquides hydatiques (LHP, LHV et LHPV).....	80
Figure 28: Les séquences d'acides aminés des protéines antigéniques les plus importantes identifiées dans les liquides hydatiques fertiles (LHP, LHV).....	83
Figure 29: Profil électrophorétique d'une 2D de l'extrait protéique de protoscolex obtenu à partir d'un liquide hydatique pulmonaire coloré avec le nitrate d'argent.....	84
Figure 30: Profils obtenus de la 2-DE des extraits protéiques solubles de protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques pulmonaires différents en utilisant un strip de 18 cm, pH 3-11 dans la première dimension suivie d'une seconde dimension sur un gel SDS-PAGE à 12% (gel Serva® de 20x20 cm).....	85
Figure 31: Profil électrophorétique d'une DIGE pour la comparaison entre deux extraits protéiques de protoscolex d'origine humaine de localisation pulmonaire et vertébrale en utilisant deux fluorophores.....	87
Figure 32: "SDS-PAGE" des protéines extraites des couches laminaires (20 µg) après coloration avec le bleu de Coomassie.....	91
Figure 33: Étude de l'antigénicité d'une couche laminaire vertébrale par Western blot.....	92
Figure 34: Étude de l'antigénicité d'une couche laminaire pulmonaire par Western blot.....	92
Figure 35: Séquence d'acides aminés de la NOS interacting protein (NOSIP) identifiée chez <i>E. granulosus</i>	93
Figure 36: Séquence d'acides aminés du PDZ neuronal nitric oxide.....	94
Figure 37: Production des nitrites par les protoscolex en présence de 10mM de L-arginine..	95
Figure 38: Effet <i>in vitro</i> du chlorure de potassium (10µM) sur la production des nitrites chez le protoscolex.....	95
Figure 39:: Coupes histologiques d'une biopsie de poumon humain observées au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine	97
Figure 40: Effet <i>in vitro</i> des métabolites du NO (Nitrites, peroxy-nitrite et nitrate) sur la viabilité des protoscolex après 24 heures d'incubation à 37°C dans le milieu DMEM enrichi avec 10% de SVF.....	98
Figure 41: Effet <i>in vitro</i> des métabolites de NO sur la viabilité des protoscolex.....	99
Figure 42: Effet <i>in vitro</i> du peroxy-nitrite sur la couche laminaire présentant un brunissement en présence de différentes concentrations croissantes de peroxy-nitrite après 48 heures d'incubation à 37°C.....	101
Figure 43: Effet <i>in vitro</i> des métabolites de NO sur l'intégrité de la couche laminaire observée sous microscope inversé.....	101

Figure 44: Effet <i>in vitro</i> des nitrites sur la membrane germinative observé au microscope inversé(GX20).....	102
Figure 45: Aspect des membranes kystiques en culture en présence de 320 μ M de nitrites après 48 heures d'incubation.....	103
Figure 46: Rôle du NO au cours de l'échinococcose kystique.....	113

**LISTE
DES
TABLEAUX**

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les caractéristiques générales des différentes souches d' <i>E. granulosus sensu lato</i>	5
Tableau 2: Classification du kyste hydatique selon GHARBI et l'OMS.....	16
Tableau 3: Effet immunorégulateur <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> d' <i>E. granulosus</i> sur la réponse immunitaire chez l'homme.....	24
Tableau 4: Les principales caractéristiques des NOS humaines.....	30
Tableau 5: Taux des nitrites ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) et des protéines dans les liquides hydatiques selon la fertilité des kystes hydatiques au cours des localisations rares.....	67
Tableau 6: Protéines d'origine humaine impliquées dans le transport.....	72
Tableau 7: Protéines d'origine humaine impliquées dans le métabolisme.....	72
Tableau 8: Identification des inhibiteurs de protéases d'origine humaine.....	73
Tableau 9: Protéines humaines impliquées dans le système immunitaire.....	73
Tableau 10: Protéines antioxydantes d'origine humaine.....	73
Tableau 11: Protéines structurales d'origine humaine.....	73
Tableau 12: Protéines identifiées dont la fonction moléculaire est inconnue.....	74
Tableau 13: Protéines parasitaires impliquées dans le métabolisme.....	76,77
Tableau 14: Protéines parasitaires de liaison.....	78
Tableau 15: Protéines parasitaires de structure.....	78
Tableau 16: Les protéines parasitaires antioxydantes.....	79
Tableau 17: Protéines parasitaires à caractère antigénique.....	79
Tableau 18: Comparaison entre les antigènes les plus importants identifiés dans les liquides hydatiques (LHP), (LHV) et (LHPV).....	81
Tableau 19: Identification des protéines de l'hôte extraites à partir de la couche laminaire...88	
Tableau 20: Identification des protéines parasitaires dans l'extrait protéique de la couche laminaire.....	89
Tableau 21: Autres protéines identifiées au niveau de la couche laminaire.....	89

**LISTE
DES
ABBREVIATIONS**

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	Adénosine diphosphate
AgB	Antigène B
B.S.A.	Bovine serum albumin
C°	Degrès Celsius
CE	Cystic echinococcosis
DTT	Dithiothréitol
<i>E. granulosus</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>
E.L.I.S.A.	Enzym linked immunoassay sorbant
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FMN	Flavine mononucléotide
FOXO-1	Forkhead box
HSP	Heat shock protein
IAA	Iodoacétamide
IFN-γ	Interféron gamma
Ig	Immunoglobulines
IL-1	Interleukine-1
iNOS	NO synthase inductible
INSP	Institut national de santé publique
LHP	Liquide hydatique pulmonaire
LHPV	Liquide hydatique paravertébral
LHV	Liquide hydatique vertébral
LPS	Lipopolysaccharides
MALDI	Matrix assisted laser desorption ionization
NADPH Oxydase	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Oxydase oxydase
NaNO₂	Nitrite de sodium
NaNO₃	Nitrate de sodium
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NO·	Monoxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthétase
ONOO·	Peroxynitrite

ONOOH	Acide peroxy nitreux
ONOONa	Peroxy nitrite de sodium
PBMCs	Peripheral blood monocyte cells
Ppm	partie par million
PBS	Phosphate buffer saline
PES	Produits de sécrétion et d'excrétion
pH	Potentiel d'hydrogène
QTOF	Quadrupole Time of Flight
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rotation par minute
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SM	Mass spectrometry
SOD	Superoxyde dismutase
SVF	Sérum de veau fœtal
TGFβ	Tumor growth factor β
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
TPx	Thiorédoxine peroxydase

INTRODUCTION

Introduction

L'échinococcose kystique est causée par la forme larvaire d'un cestode appelé *Echinococcus granulosus*. C'est une maladie cosmopolite qui sévit de façon endémique dans de nombreux pays du bassin méditerranéen. C'est le cas de l'Algérie où elle constitue un problème de santé publique (**27^{ème} congrès mondial de l'échinococcose kystique**). Cette macroparasitose est caractérisée par sa persistance chez l'hôte intermédiaire entraînant l'infection chronique. Les études menées sur le plan fondamental sur cette parasitose tendent à une meilleure compréhension des mécanismes associés à l'interaction hôte/*Echinococcus granulosus*. Des études focalisées sur des fonctions biologiques tels que le développement du macroparasite et les stratégies d'échappement adoptées par ce dernier en faveur de sa persistance chez l'hôte accidentel plus particulièrement l'homme ont été entreprises afin de comprendre les mécanismes qui régissent son instauration et sa persistance, malgré l'engagement d'une réponse immunitaire plurielle portant sur les modalités de la variation antigénique exprimée par la larve hydatique. Les échinococcoses représentent l'une des interactions hôte-parasite les plus durables et les plus silencieuses. Les mécanismes interrelationnels mettant en jeu l'homme et le macro-parasite commencent à être élucidés en particulier par notre équipe (**Amri et al., 2009; Amri et Touil-Boukoffa, 2015; Soufli et al., 2015; Khelifi et al., 2017**).

Des études menées *in vitro* et *in vivo* ont mis en exergue l'implication du monoxyde d'azote dans l'action antihydatique. Il a été rapporté dans ce sens, que l'expression accrue de l'IFN- γ conduit à l'augmentation des teneurs en nitrites sous l'action de la voie de la NOS2 (**Touil-Boukoffa et al., 1998; Ait Aissa et al., 2006; Amri et al., 2007**). À l'inverse, la production accrue et chronique de l'IL-4 et l'IL-10 est en faveur de l'instauration d'un mécanisme d'évasion parasitaire (**Amri et al., 2009; Amri et Touil-Boukoffa, 2015**).

Sur la base des résultats obtenus, à travers nos travaux antérieurs, soulignant l'effet dégénératif et scolicide du monoxyde d'azote et de ses dérivés (**Zeghir-Bouteldja et al., 2009**), il nous a paru intéressant de situer l'impact exercé par les NO synthases et le NO produit de façon chronique au cours de cette parasitose, sur le parasite lui-même et le microenvironnement tissulaire avoisinant le kyste dans les organes cibles.

Nous avons entrepris dans ce sens, une étude comparative portant sur les localisations kystiques rares, fréquentes et le degré de fertilité parasitaire.

Notre travail s'articule essentiellement autour des points suivants:

- L'étude de la production systémique du monoxyde d'azote au cours des localisations rares et fréquentes de l'hydatidose.

- L'étude de la production du NO dans les liquides hydatiques selon leurs localisations anatomiques ainsi que leur degré de fertilité.
- L'étude comparative du protéome des liquides hydatiques de localisations rares (vertébrale et paravertébrale) et fréquentes (pulmonaire).
- La recherche *in silico* d'une NOSynthase putative au niveau d'*Echinococcus granulosus*.
- L'évaluation de la relation entre le taux de NO produit *in vivo, in situ* et les protéines identifiées dans les liquides hydatiques.
- La mise en évidence de "biomarqueurs" relatifs aux altérations consécutives à la production chronique du NO.

REVUE
BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. L'échinococcose Kystique

I.1.1. Définition

L'hydatidose ou encore l'échinococcose kystique est une zoonose commune à l'homme et à de nombreux mammifères. Elle est causée par la forme larvaire d'un cestode appelé *Echinococcus granulosus*. Elle est caractérisée par la présence de larves vésiculaires au niveau de l'organisme des mammifères carnivores, canidés et plus rarement Félidés (Thompson, 1995). Chez un hôte intermédiaire susceptible, l'embryon peut former des kystes hydatiques renfermant des protoscolex.

I.1.2. Aperçu historique

L'hydatidose est une zoonose qui existait depuis très longtemps. Waters-Rist et al., (2014) ont rapporté la découverte d'un kyste hydatique chez une femme jeune qui date de la période néolithique. Le kyste hydatique fut connu depuis l'antiquité. Hippocrate et Galien y font une allusion dans leurs écrits et signalèrent sa présence dans le foie humain. En 1782 Goeze démontra l'origine parasitaire du kyste hydatique. En 1804, R. Laennec mit en évidence la différence entre l'hydatidose humaine et animale. En 1835, Von Siebold identifia le parasite et son mode de transmission. Une étude de la thérapeutique de la maladie à l'occasion du premier congrès mondial sur le kyste hydatique à Aigre fut réalisé en 1950. Depuis 1996 à ce jour, le 27^{ème} congrès mondial de l'échinococcose a été organisé conjointement par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en Algérie, à l'issue de cette rencontre, le traitement médical (Albendazole) sera préconisé prochainement et autorisé en vente en Algérie.

I.1.3. La classification d'*E. granulosus*

Le débat taxonomique se poursuit encore aujourd'hui au sein d'*E. granulosus*. Ce dernier présente une grande diversité (Xiao et al., 2005; Ito et al., 2006; Yang et al., 2006; Craig, 2007). Cependant ce parasite est classé comme suit :

Phylum: Platyhelminthe

Sous-Phylum: Neodermata

Classe: Cestoda

Sous-Classe: Eucestoda

Ordre: Cyclophyllidea

Famille: Taeniidae

Genre: *Echinococcus*

Espèce: *Echinococcus granulosus*

-Les espèces: avant la révision récente de la classification des échinocoques, quatre espèces du genre *Echinococcus* étaient reconnues. Ces espèces sont morphologiquement distinctes aussi bien au stade adulte qu'au stade larvaire. Actuellement cinq espèces ont été décrites:

- *Echinococcus granulosus*: provoque l'hydatidose ou la maladie du kyste hydatique
- *Echinococcus multilocularis*: provoque l'échinococcose alvéolaire
- *Echinococcus vogeli*: provoque l'échinococcose polykystique
- *Echinococcus oligarthrus*: dans de rares cas provoque l'échinococcose humaine
- *Echinococcus schiui*: connue uniquement chez les renards du Tibet en Chine (Xiao et al., 2005).

-Les souches d'*E. granulosus*: Onze souches d'*E. granulosus* sont reconnues actuellement (Tableau 1). Il est clair qu'*E. granulosus* contient un nombre important de variantes avec des différences observées au niveau de la morphologie, la spécificité de l'hôte, les caractéristiques biochimiques, la biologie du développement et la répartition géographique (Lymbery et al., 2014; Romig et al., 2015).

-Le génotype: des études génétiques ont montré une variabilité trop hétérogène pour que *E. granulosus sensu lato* ne soit contenu que dans une espèce unique. Cette variation génétique détermine un phénotype caractéristique conduisant ainsi à une nomenclature génotypique (G) (Tableau 1). *E. granulosus sensu lato* est actuellement subdivisé en *Echinococcus granulosus sensu stricto* (G1-3), *Echinococcus felidis* (la souche du lion), *Echinococcus equinus* (G4), *Echinococcus ortleppi* (G5) et *Echinococcus canadensis* (G6-G10) (Nakao et al., 2013a, 2013b; Lymbery et al., 2015; Thompson et Jenkins, 2014; Romig et al., 2015)

Il a été rapporté que la moindre variation génétique observée peut être corrélée avec une différence épidémiologique et peut donc justifier l'isolement du groupe qui la présente (Siracusano et al., 2012a; Romig et al., 2015).

Tableau1: Les caractéristiques générales des différentes souches d'*E.granulosus sensu lato* (Thompson et Lymbery, 1990; Scott et al., 1997; Zhang et al., 1998a,b; Romig et al., 2015).

Désignation			Hôtes intermédiaires et accidentels	Hôtes définitifs	Distribution géographique probable
Souche	Génotype mitochondrial	Espèces			
Souche ovine commune	G1	<i>E. granulosus sensu stricto</i>	Caprinés, les bovinés, suidés, camilidés, macropodidés, homme	Chien, renard, dingo, hyènes	Cosmopolite
Souche ovine de Tasmanie	G2		Caprinés, bovinés, homme	Chien, renard	Tasmanie, argentine, Europe
Souche du buffle	G3		Caprinés, bovinés, homme	Chien, renard	Asie, Europe
Souche équine	G4	<i>E. equinus</i>	Équinés	chien	Europe, moyen orient, Afrique, Amérique, Nouvelle Zélande
Souche bovine	G5	<i>E. ortleppi</i>	Bovins, homme	Chien	Europe, Amérique du sud, Afrique du sud et centrale, Asie du sud, Fédération de Russie
Souche cameline	G6	<i>E.canadensis</i>	Camélidés, caprinés, Bovins, homme	Chien	Moyen orient, Afrique, Amérique du sud, Asie centrale.
Souche porcine	G7/G9		Suidés, homme	Chien	Europe, Fédération de Russie, Amérique du sud
Souche du cervidé	G8/G10		Cervidés, homme	Loup, Chien	Amérique du nord, Eurasie
Souche du lion		<i>E. felidis</i>	Équinés, antilopinés, bovinés, giraffidés, hippopotamidés	Lion	Afrique

I.1.4. Epidémiologie de l'hydatidose

I.1.4.1. Dans le monde

Récemment, l'organisation mondiale de la santé a classé l'échinococcose avec les zoonoses négligées durant la période de 2008–2015 (Budke *et al.*, 2009). Ce groupe a été considéré dans ses stratégies et ses plans d'action établis pour le contrôle des maladies tropicales négligées (Craig *et al.*, 2007; Menezes da Silva, 2010). Cependant, l'hydatidose prédomine dans les régions chaudes telles que l'Amérique du Sud, la Russie, l'Asie centrale, la Chine, l'Australie, et une partie de l'Afrique (Yu *et al.*, 2006; Carmena *et al.*, 2008; Dakkak, 2010). Aux Etats Unis d'Amérique, la plupart des infections ont été diagnostiquées chez les migrants provenant des régions endémiques. L'Afrique du Nord est une des régions du monde où l'échinococcose à *E.granulosus* sévit à l'état endémique. Elle représente une problématique majeure de santé publique (Figure 1).

I.1.4.2. En Algérie

L'Algérie est un pays d'élevage traditionnel de type pastoral, et comme certains pays du bassin méditerranéen, c'est une zone endémique. L'hydatidose est considérée comme étant une maladie à déclaration obligatoire par l'institut national de santé publique (INSP). L'incidence annuelle est de 1.11/100,000 d'habitants. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la fréquence de cette maladie, à savoir l'élevage de moutons, le nombre de chiens errants et l'humidité propice pour l'entretien des embryophores dans le milieu extérieur. Ce sont des facteurs auxquels s'ajoutent parfois les règles d'hygiène insuffisantes (Bezzari *et al.*, 1999; Possentiet *al.*, 2016).

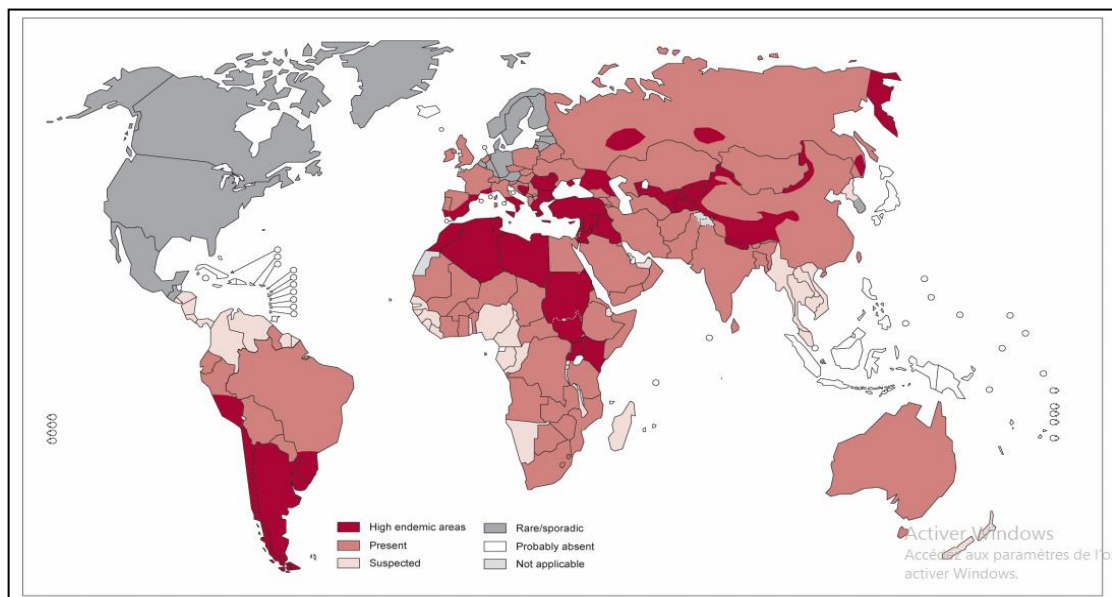


Figure 1: Répartition géographique de l'échinococcose kystique dans le monde (OMS, 2012)

1.1.4.3. Epidémiologie des souches d'*E. granulosus*

E. granulosus sensu stricto (G1) représente la plupart de la charge mondiale, suivie par *E. canadensis* (G6 et G7) en Amérique du Sud et dans le monde (Cucher et al., 2015).

En Algérie, la souche ovine d'*E. granulosus* apparaît la plus incriminée dans l'infection de l'homme, bien qu'une souche cameline a été aussi mise en évidence, avec de possibles croisements inter-souches (Figure 2). La caractérisation moléculaire de cinq isolats a permis d'identifier l'espèce *E. granulosus sensu lato* (Zait et al., 2014). Une étude menée sur le génotypage a révélé la présence d'*E. granulosus sensu stricto* chez l'humain et chez les animaux domestiques avec prédominance de la souche G1. *E. canadensis* G6 a été identifiée chez l'humain et chez le dromadaire spécifiquement au sud Algérien (Zait et al., 2016).

Cependant, une étude menée dans cette région a mis en évidence la présence de deux génotypes distincts: le génotype G1 (souche ovine) circulant entre les ovins, bovins, caprins et plus de la moitié des camelins, transmissible aux humains. La présence du génotype G1 chez les camelins, suggère que les camelins dont les kystes sont le plus souvent fertiles, pourraient représenter, dans les régions du sud, une source de transmission.

Le génotype G6 (souche cameline): évoluant chez les camelins est trouvé parfois chez les autres ruminants. Cependant, la variation génétique pourrait influencer la spécificité de l'hôte, la vitesse de développement, sa pathogénicité, l'antigénicité, la dynamique de transmission et la sensibilité aux agents chimiothérapeutiques et enfin le développement des vaccins (Alvarez Rojas et al., 2014).



Figure 2: Morphologie du ver adulte d'*E. granulosus* de 35 jours (Thompson et McManus, 2001). (a) Souche ovine d'*E. granulosus*, le parasite mesure 2,2 mm de long, (b) Souche bovine d'*E. granulosus*, le parasite mesure 3,6 mm de long.

I.1.5. Le cycle de vie d'*E. granulosus*

Le cycle parasitaire comprend deux hôtes: un hôte définitif (HD) qui héberge le ver adulte et un hôte intermédiaire (HI) qui héberge la larve hydatique. Le cycle classique est le cycle domestique: chien(HD)-mouton (HI) (**Figure 3**). L'homme s'insère accidentellement dans le cycle du parasite constituant une impasse épidémiologique.

L'homme se contamine accidentellement par l'ingestion d'embryophores (œufs sans coque externe) recueillis sur le pelage du chien ou de façon indirecte à partir d'aliments souillés par des fèces du chien infesté (**Aubry, 2013**). L'embryon hexacanthé libéré dans le tube digestif, traverse la paroi intestinale. Il est doué d'une plasticité importante qui lui permet de franchir tous les capillaires. Ainsi, il gagne via le système porte, le foie, les poumons et les autres points de l'organisme (**Thompson, 1995**). Il s'arrête dans le premier filtre hépatique dans 50% à 60% des cas, puis dans le deuxième filtre pulmonaire dans 30% à 40% des cas et dans le reste de l'organisme (os, cerveau, thyroïde,...) dans 10% des cas. Il s'y développe lentement et devient un kyste hydatique.

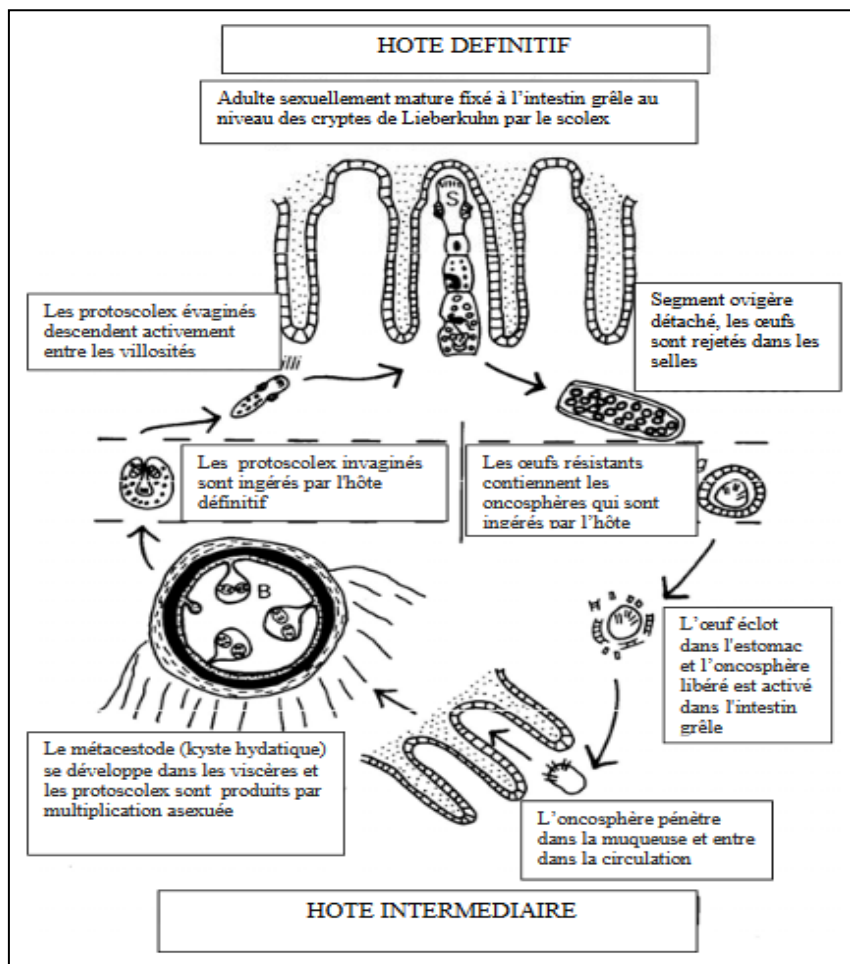


Figure 3: Le cycle évolutif basique d'*E. granulosus* (**Thompson, 1995**).

Chez le mouton, les protoscolex se forment après neuf mois de l'infection par des œufs ingérés. Le cycle de vie se perpétue chez le chien ou chez d'autres canidés si ces derniers digèrent des organes infestés de kystes hydatiques fertiles. Les scolex s'attachent à la paroi intestinale du chien et évoluent vers un ver adulte qui produit des œufs infestants (embryophores) 47-61 jours après ingestion des kystes fertiles.

I.1.6. Description des formes parasitaires d'*E. granulosus*

I.1.6.1. Le ver adulte

E. granulosus possède certaines caractéristiques uniques. Le ver adulte mesure de 2 à 7mm. La partie antérieure du ver appelée scolex présente un système de fixation qui permet l'accrochage du parasite à la muqueuse intestinale de l'hôte définitif. Le scolex est constitué de deux rangées de crochets et de quatre ventouses musculaires (**Figure 4**). La forme adulte est caractérisée par un corps allongé (strobile) constitué de proglottis. Le strobile comprend six à deux segments reproductifs hermaphrodites. Il ne possède pas d'intestin et tous les échanges métaboliques se font à travers son tégument. La position des pores génitaux est fonction du genre et de la souche, elle est importante dans l'identification des espèces. L'utérus gravide est dilaté après fertilisation et développement des œufs. Le dernier segment ovigère a une taille importante (environ le tiers du parasite adulte). Il contient un utérus tubulaire. Les segments ovigères se détachent tous les 7 à 14 jours. Chaque segment contient environ 500 à 600 œufs. La plupart des vers adultes sont attachés aux villosités dans le tiers supérieur de l'intestin grêle du chien (**Thompson et McManus, 2001**).

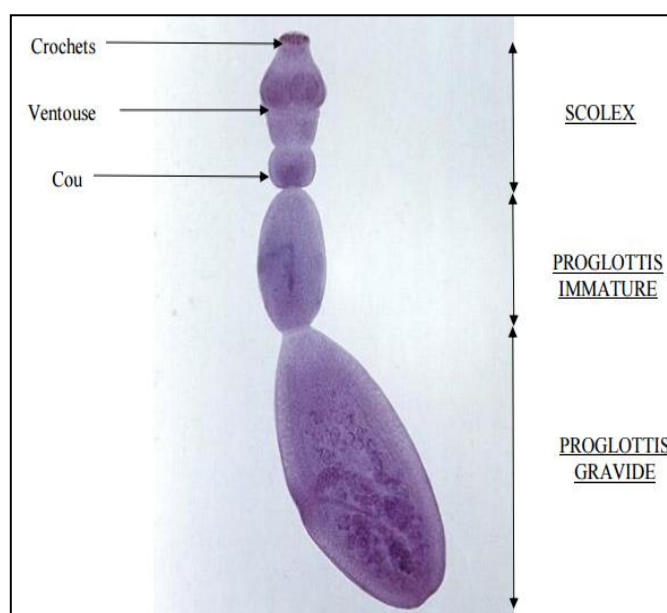


Figure 4: Morphologie du ver adulte d'*E. granulosus* (Moulinier, 2000)

I.1.6.2. Les œufs

Les œufs produits sont ovoïdes de 30-40 µm de diamètre. Ils sont morphologiquement identiques à ceux des autres ténias. Ils renferment un embryon sphérique hexacanthé portant six crochets. L'ontosphère est le premier stade larvaire entouré par plusieurs enveloppes constituant une paroi formée de plusieurs couches kératinisées qui donnent à l'œuf un aspect sombre et strié. La capsule externe disparaît rapidement après libération des œufs par l'hôte définitif (**Figure 5**).

Les œufs sont résistants aux facteurs de l'environnement et restent infestants pendant plusieurs mois jusqu'à un an dans un environnement à des températures environ +4°C à +15°C. Les températures comprises entre 60 à 80°C tuent les œufs d'*E. granulosus* en 5minutes. Les œufs survivent plus longtemps à de basses températures (**Gemmell et Lawson, 1986; Eckert et al., 1992; Thompson et Mcmanus, 2001**).

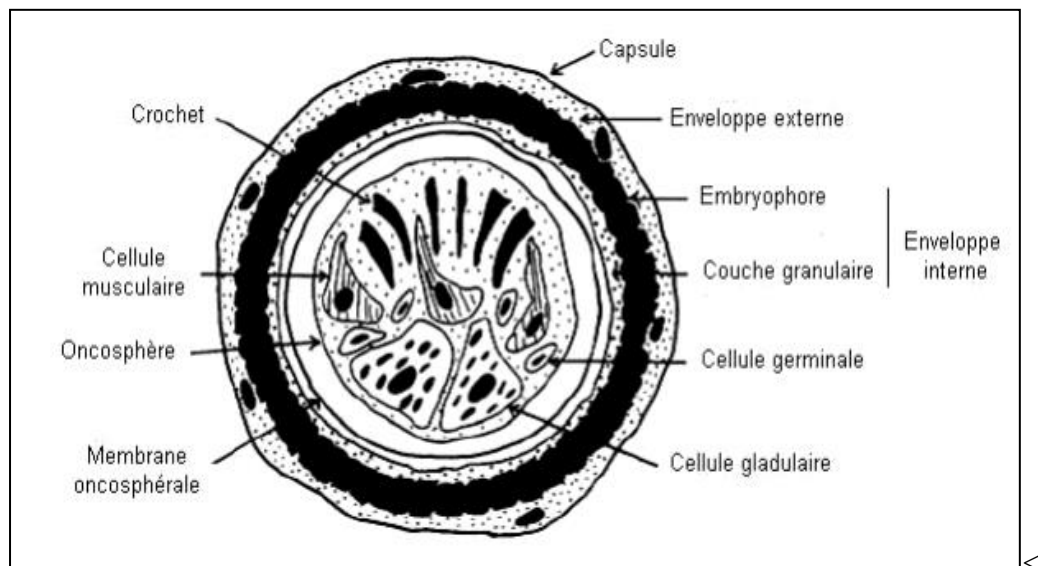


Figure 5: Schéma d'un œuf d'*E. granulosus* (Thompson, 1995; Eckert, 2001)

I.1.6.3. Le metacestode (la larve hydatique)

C'est la vésicule hydatique, elle est remplie d'un liquide hypotonique clair comme de l'eau de roche entourée de deux membranes accolées l'une à l'autre (**Figure 6**). Les membranes du kyste hydatique sont capables du transport actif, de l'absorption sélective et d'excrétion (**Zhang et al., 2003**). La croissance et la vitesse de son évolution varient largement entre les espèces et dépendent aussi de la nature de la relation hôte/parasite (**Gemell et Lawson, 1986; Barnes et al., 2007**). Elle est estimée chez l'humain de 1,5 à 15mm/an pouvant atteindre une taille variable entre 1 à 15 cm (**Siracusano et al., 2012a**).

1.1.6.3.1.L'adventice

Appelée aussi le péricyste et ectokyste, c'est une couche non parasitaire. Elle est constituée de cellules de l'hôte. C'est une couche nécessaire à la survie du parasite, la fonction de ce péricyste semble être la protection et la nutrition. L'existence de petits vaisseaux au niveau du péricyste en relation avec le parasite souligne une étroite interaction entre le parasite et le tissu qui l'héberge. Une dégénérescence au niveau du péricyste entraîne une dégénérescence du kyste hydatique ou une expulsion spontanée dans certains cas (**EJ Golzari et Sokouti, 2014**).

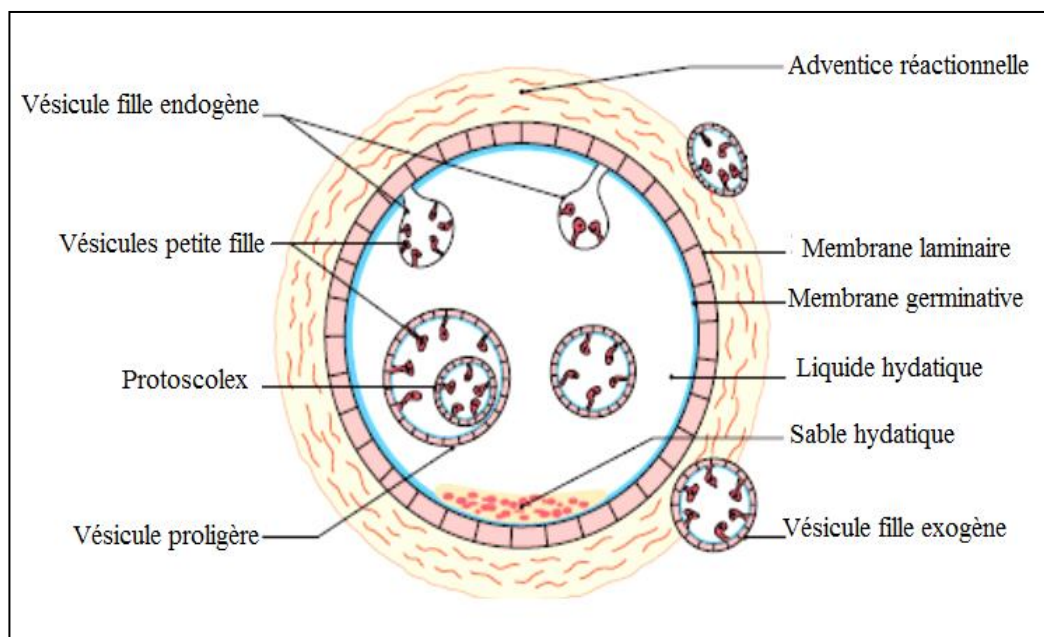


Figure6: Structure du kyste hydatique (**Euzéby, 1971**)

Le kyste hydatique est composé de deux couches, une membrane interne parasitaire et une couche acellulaire externe dite laminaire d'épaisseur variable (**Diaz et al., 2011**).

1.1.6.3.2. La couche laminaire externe ou cuticule

Cette couche est mise en place très tôt au cours du développement du macroparasite, elle est produite par la membrane germinative. Elle est unique au genre *Echinococcus* de consistance élastique (**Freire et al., 2004**). Elle est striée longitudinalement, d'aspect hyalin. La couche laminaire est produite par l'embryon hexacanthe. Elle revêt la face interne du kyste hydatique et des vésicules filles libres dans la cavité. Elle évolue avec l'augmentation du volume de la larve hydatique et s'épaissit avec l'âge du kyste, elle est perméable aux éléments de l'hôte.

La structure moléculaire de la couche laminaire a été décrite. Elle est constituée d'un complexe de protéines, de glucides et de lipides. Elle est essentiellement composée de glycoprotéines hautement o-glycosylées de type mucine (**Diaz et al., 2011**) (**Figure 7**). La membrane laminaire d'*E. granulosus* contient des nanodépôts de sels decalcium de l'inositol hexakisphosphate (InsP6) (**Irigoin et al., 2002, 2004; Casaravilla et al., 2006**).

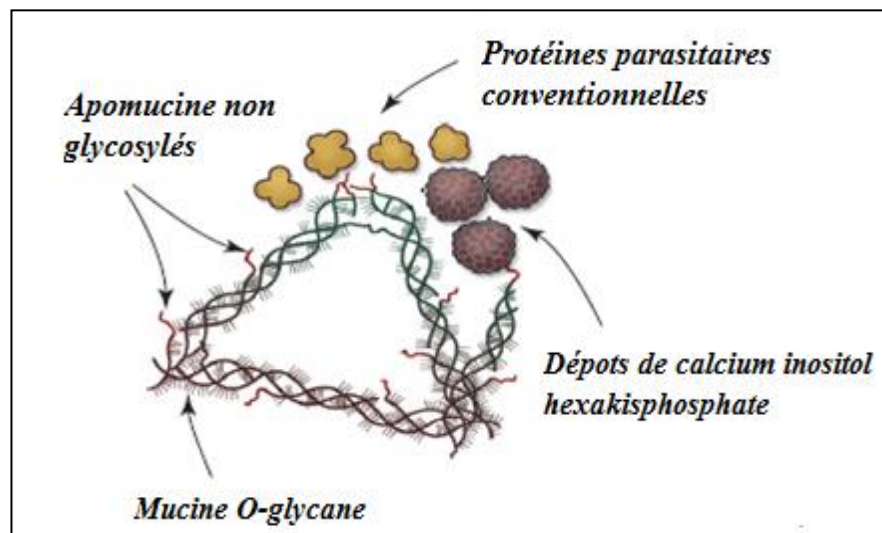


Figure 7: Structure de la couche laminaire (**Diaz et al., 2011**)

La couche laminaire assure deux fonctions, elle fournit un support mécanique pour le liquide hydatique et joue un rôle majeur dans la protection de la larve hydatique contre les stress environnementaux et la réponse immunitaire permettant l'établissement et la persistance de la parasitose (**Freire et al., 2004**).

1.1.6.3.3. La membrane germinative interne ou proligère

La membrane germinative est très mince (15-20µm) (**Rippert, 1998**). Elle est responsable de la formation des protoscolex et de la synthèse de la couche laminaire. Elle contient le tégument ainsi que plusieurs types cellulaires comportant des cellules indifférenciées prolifératives responsables de la formation des capsules proligères qui se développent en protoscolex, des parasites immatures qui sont attachés à la membrane ou sont libres dans le liquide hydatique formant ainsi le sable hydatique (**Galindo et al., 2008; Diaz et al., 20011**). La membrane germinative joue un rôle important dans la survie du parasite car elle assure sa nutrition, l'excrétion et joue un rôle dans l'échappement au système immunitaire (**Amri et Touil-Boukoffa, 2015**).

1.1.6.3.4. La fertilité de l'hydatide

Un kyste hydatique est dit fertile s'il produit des capsules proligères avec formation de protoscolex (**Rippert, 1998**). D'autres paramètres sont considérés tels que la couleur blanchâtre du liquide hydatique et l'épaisseur de la membrane germinative (**Bortoletti et Ferreti, 1978**). Cependant, dans les kystes fertiles, la membrane germinative est translucide, granulaire et contient des capsules proligères renfermant des protoscolex au nombre de 6 à 12 (**Galindo et al., 2002; Rogan et al., 2006**). Ces derniers se transforment en vers adultes chez leur hôte définitif. Ils peuvent également se transformer en kystes secondaires suite à la rupture d'un kyste lors de l'intervention chirurgicale. Ils forment ainsi des vésicules filles constituées des deux membranes pouvant contenir des protoscolex et des capsules proligères qui sont la réplique exacte de la larve mère (**Thompson, 1995**). Les vésicules filles peuvent être enveloppées ensemble dans la larve mère donnant l'aspect d'un kyste multi-vésiculaire ou se retrouvent libres dans la cavité kystique. Chez certains animaux, une grande partie des kystes peut être stérile (**Lewall, 1998**). Il a été rapporté que l'infertilité des kystes hydatiques chez les bovins serait associée à une inhibition de la prolifération et le développement des protoscolex par des immunoglobulines de type IgGs reconnaissant des antigènes impliqués dans ce processus induisant ainsi un processus d'apoptose (**Paredes et al., 2011**).

Il a été également suggéré que la composition biochimique des membranes kystiques jouerait un rôle important dans le métabolisme, la physiologie ainsi que l'immunologie de l'hydatidose. Cependant, une variation dans la composition biochimique reflète une variation des souches infestantes chez les différents hôtes intermédiaires (**Thompson et al., 1995; Shaafie et al., 1999; Meerkhan, 2013**).

1.1.6.3.5. Le liquide hydatique

C'est un liquide limpide, eau de roche emplissant la lumière du kyste hydatique. Le liquide hydatique est un liquide complexe constitué de molécules d'excrétion et de sécrétion des protoscolex et de la membrane germinative et des protéines de l'hôte. Les molécules parasitaires peuvent être douées de propriétés antigéniques telles que l'Ag5 et l'AgB (**Hamrioui et al., 1988; Siracusano et al., 2012a,b**). La composition chimique du liquide hydatique est identique à celle du sérum de l'hôte (Na, K, Cl, CO₂) avec une densité comprise entre 1.008 et 1.015 et un pH alcalin. Le liquide hydatique contient aussi des protoscolex qui constituent le sable hydatique (**Menezes da Silva, 2010; Siracusano et al., 2012 a**).

I.1.6.3.6. Le protoscolex

C'est la forme préadulte d'*E. granulosus*. La production des protoscolex est asynchrone d'où leur présence à des stades différents à l'intérieur d'une même capsule. Elle est présente dans la larve hydatique et peut interagir avec l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire. Les protoscolex se développent et évoluent vers le stade "ver adulte" et peuvent également se différencier en d'autres kystes quand ces derniers sont libérés au niveau de l'organisme de l'hôte intermédiaire suite à une rupture d'un kyste. Des études suggèrent que le protoscolex sécrète des molécules qui permettent au parasite de coloniser le tissu et de s'établir au niveau des organes cibles (Dzik, 2006). Des études transcriptomiques ont souligné le rôle non négligeable des protéines sécrétées par les protoscolex dans l'adaptation métabolique d'*E. granulosus* en faveur de la persistance de la parasitose (Pan et al., 2014).

I.1.7. La spécificité de l'hôte

La caractéristique unique de la larve hydatique fertile est de se développer de manière bidirectionnelle en ver adulte dans le tube digestif chez le chien ou en Kyste hydatique secondaire chez l'hôte intermédiaire suite à une rupture des membranes kystiques. Il a été rapporté que ce processus est induit par les acides biliaires (Zhenget al., 2013).

I.1.7.1. La spécificité de la forme adulte

La forme adulte d'*E. granulosus* ne semble pouvoir se développer que chez un canidé sauvage ou domestique et plus précisément, les espèces du genre *Canis* sont plus réceptives au parasite (Euzéby, 1971). Des facteurs anatomiques, biochimiques et physiologiques interviennent sans doute, dans la spécificité de l'hôte définitif. Les duodénums des carnivores communs susceptibles d'héberger le parasite (chien, chat, renard) présentent des différences morphologiques, notamment sous le rapport de la taille et de la forme des villosités et des glandes de Lieberkuhn. La composition de la bile est variable suivant l'hôte éventuel, ce paramètre revêt aussi une grande importance au moment de l'implantation initiale du parasite (Smyth, 1990; Zheng et al., 2013).

I.1.7.2. Spécificité de la forme larvaire

La spécificité de l'hôte de la forme larvaire est surtout visible en comparant les différentes souches au sein de l'espèce *E. granulosus*. Chaque souche a un hôte intermédiaire préférentiel mais peut également se développer chez d'autres hôtes, avec un rendement moindre.

I.1.8. Les caractéristiques cliniques de l'hydatidose

I.1.8.1. Les symptômes de l'hydatidose

L'hydatidose est une affection silencieuse qui peut rester asymptomatique pendant des années. Elle est découverte à l'occasion d'une radiographie ou d'une complication. Le métacestode se développe à des vitesses variables. En grossissant, le kyste commence à exercer une pression mécanique sur les tissus périphériques de l'hôte pouvant occasionner des événements pathologiques.

La diversité des manifestations cliniques du kyste hydatique est liée à :

- Son siège anatomique (sa localisation), sa taille et donc son effet de masse sur les organes adjacents;
- L'état du kyste hydatique;
- Sa rupture spontanée ou traumatique;
- Son extension secondaire;
- La libération d'antigènes parasitaires responsables d'une réaction d'hypersensibilité systémique.

Les kystes peuvent se développer à une vitesse de 1 à 50mm par an ou persistent sans changement pendant des années. Une symptomatologie aiguë peut survenir lorsque le kyste se rompt instantanément ou suite à un traumatisme. Il peut également dégénérer, s'involuer ou se calcifier (**Mufit et al., 1998; Frider et al., 1999; Wang et al., 2006**). L'infection bactérienne du kyste hydatique est plus souvent observée après rupture et constitue une complication sérieuse (**Pedrosa et al., 2000; Ekert et al., 2001**).

I.1.8.2. Les localisations du kyste hydatique

Au cours de l'échinococcose primaire, les localisations les plus fréquentes des kystes hydatiques sont le foie (60 à 70%) ou le poumon (20 à 30%), le ratio foie/poumon peut varier entre 2 à 1 à 7 ou plus (1/5) (**Larrieu et Frider, 2001**). La larve hydatique peut affecter d'autres organes dans 10% des cas tels que le rein, le pancréas, l'os et le système nerveux central. Dans les os, l'hydatide est mal limitée (pas d'adventice) prenant un aspect multivésiculaire. L'hydatidose n'est parfois découverte qu'à la suite d'une fracture spontanée, elle est d'exérèse difficile. Tous les organes et les tissus peuvent être le siège d'une hydatidose.

I.1.9. Les méthodes de diagnostic

Les travaux effectués sur *E. granulosus* ont pour intérêt le développement des méthodes de diagnostic. Plusieurs méthodes ont été utilisées basées sur les antigènes du liquide hydatique. L'antigène 5 et l'antigène B purifiés ou sous forme recombinante ou leurs peptides ainsi que d'autres molécules recombinantes potentiellement antigéniques n'ont pas été encore utilisées dans les tests de routine.

I.1.9.1. Le diagnostic radiologique

Le diagnostic radiologique est basé sur la détection des kystes hydatiques ou vésicules hydatiques qui peuvent être rencontrés dans n'importe quel organe et tissu. Il est réalisé par radiographie sans préparation, échographie, scanner, Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), la scintigraphie, et par sonographie et tomodensitométrie (**Pawlowski et al., 2001; Craig et al., 2006**).

En 1995, le Groupe de Travail Informel mené sous l'égide de l'OMS (IWGE 'Informal working group Ethic) a développé une classification normalisée qui pourrait être appliquée dans tous les paramètres pour remplacer la pléthore de classifications précédentes (**Tableau 2**). Ainsi, elle permet un regroupement naturel des kystes en trois groupes concernés: actif (CE1 et 2), transitionnel (CE3) et enfin inactif (CE4 and 5) (**Brunetti et al., 2010**).

Tableau2: Classification du kyste hydatique selon GHARBI et l'OMS (**Gharbi et al., 1981; Pawlowski et al., 2001; Macpherson et al., 2003 ; Wang et al., 2003; Brunetti et al., 2010; OMS, 2017**).

GHARBI	OMS	Signification
Type I	CE1 (liquide pur)	Lésions actives et fertiles
Type III	CE2 (vésicules)	Lésions actives et fertiles
Type II	CE3 (membrane)	Lésions transitionnelles, kystes en voie de dégénérescence. Evolution possible vers un type CE2
Type IV	CE4 (pseudotumoral)	Lésions inactives, kystes dégénérés très probablement stériles.
Type V	CE5 (lésion calcifiée)	Lésion inactives, kystes dégénérés, très probablement stériles

CE: 'cystic echinococcosis'

1.1.9.2. Le diagnostic biologique

Toute suspicion radiologique en faveur d'un kyste hydatique doit être complétée et confirmée par une investigation biologique. La phase d'instauration «cestodose» provoque une hyperéosinophilie sanguine élevée. La sérologie, associée aux signes cliniques et aux techniques d'imagerie, a beaucoup de valeur pour le diagnostic de l'hydatidose avant l'intervention chirurgicale. Les méthodes utilisées sont nombreuses. Certaines sont sensibles et sont utilisées comme test de dépistage: l'immunofluorescence indirecte, l'hémagglutination indirecte, ELISA. D'autres sont plus spécifiques: l'électrosynérèse, l'immunoélectrophorèse avec identification d'un arc spécifique (l'arc 5) et le western blot. Ces dernières sont utilisées comme techniques de confirmation (**Siles-Lucas et Gottstein, 2001; Ito et Craig, 2003; Siracusano et Bruschi, 2006**).

1.1.10. Le traitement de l'hydatidose

Au cours des 20 dernières années, le traitement de la maladie hydatique a connu lui aussi de véritables bouleversements dominés par le développement de nouveaux protocoles incluant des traitements médicaux et des ponctions guidées. Le traitement chirurgical reste le traitement le plus souvent adopté devant la présence de kystes hydatiques au niveau de l'organisme néanmoins l'introduction du mebendazole (MBZ) en 1970 et de l'albendazole en début de 1980 et l'implémentation percutanée au milieu des années 80 ont été considérées. À l'heure actuelle, le traitement dépend du stade et de la taille du kyste hydatique, mais également de la présence ou non de complications (**Brunetti et al., 2010; Menezes da Silva, 2010**).

Une nouvelle méthode a été introduite, il s'agit de la méthode de «Watch and Wait». Certains experts recommandent que les kystes inactifs et non compliqués du foie ne nécessitent pas de traitement mais une surveillance régulière aux ultrasons par l'approche «Watch and Wait». Cette approche a été appliquée suite à des observations qui ont montré que 20% des kystes deviennent spontanément inactifs et restent dans un état stable d'inactivité en fonction du temps alors que certains kystes sont temporairement inactifs chez certains patients traités (**Frider et al., 1999; Keshmiri et al., 2001; Larrieu et al., 2004; Whang et al., 2006; Junghanss et al., 2008; Li et al., 2011**).

Des travaux de recherche ont été initiés afin de rechercher des biomarqueurs de viabilité associés à l'activité métabolique du metacestode. Ces biomarqueurs présenteraient un intérêt dans le contrôle de la parasitose et le suivi des patients mis sous chimiothérapie (**Gottstein et al., 2014**).

I.1.11. La vaccination

I.1.11.1. Chez l'hôte intermédiaire

Le développement du vaccin (EG95) protégeant le mouton contre *E. granulosus* présente des perspectives prometteuses. Les essais de la phase I du vaccin EG95 à base d'un antigène recombinant isolé de l'onchosphère montrent qu'il confère une protection atteignant 96 à 98 % chez le mouton contre une infestation expérimentale par *E. granulosus*. La durée de cette protection, qui peut être transmise aux agneaux par le colostrum, peut atteindre 12 mois. La vaccination du mouton devrait être utilisée en association avec le traitement anthelminthique des chiens et avec les programmes d'éducation sanitaire (**Lightowers et al., 1996**).

I.1.11.2. Chez l'hôte définitif

Une activité de recherche considérable a été entreprise en vue de protéger les chiens contre l'échinococcose en utilisant des antigènes totaux, mais sans succès jusqu'à aujourd'hui. Les progrès dans ce domaine nécessitent des recherches fondamentales portant sur l'immunologie de la muqueuse intestinale lors de l'infestation par *E. granulosus*. En particulier, l'étude de la réponse inflammatoire due à la présence du ver adulte d'*E. granulosus*.

I.1.12. Les stratégies de lutte et de prévention contre l'hydatidose

L'échinococcose kystique est une maladie évitable car des espèces animales domestiques en sont les hôtes définitifs et intermédiaires. Il a été démontré que la vermifugation périodique du chien, l'amélioration de l'hygiène lors de l'abattage (y compris la destruction appropriée des abats infectés) et les campagnes de sensibilisation du grand public permettaient de réduire et de prévenir la transmission, et d'atténuer la charge de morbidité chez l'homme. L'organisation mondiale de la santé (OMS) contribue à sélectionner les pays où la maladie sévit hautement, en vue d'élaborer et de mettre en œuvre des projets pilotes conduisant à la validation, d'ici 2020, des stratégies efficaces de lutte contre l'échinococcose kystique. La priorité sera donnée à l'intensification des interventions dans certains pays afin de combattre et d'éliminer au moyen d'une stratégie validée le problème de santé publique que représente l'échinococcose kystique (**OMS, 2017**).

I.1.13. Le génome d'*E. granulosus* et la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques

Des travaux sur la publication de la séquence complète du génome d'*E. granulosus* ont marqué le début de l'ère de la génomique et de la protéomique. Cela a permis, en particulier, de mettre en évidence des voies métaboliques associées au mode de parasitisme ainsi que

l'importance des échanges avec la cellule-hôte. Plusieurs gènes ont été identifiés notamment les gènes qui codent pour l'AgB, les gènes qui codent pour les protéines des voies biliaires et qui pourraient être impliquées dans la bipolarité de développement des parasites ainsi que plusieurs gènes impliqués dans la nutrition, l'échappement au système immunitaire et la strobilisation (Zheng *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014).

I.1.14. L'immunopathologie de l'infection parasitaire par *E. granulosus*

La survie du parasite dans son environnement repose sur la mise en place par celui-ci d'un système d'échange avec l'hôte. La relation entre le macroparasite et son hôte qui l'héberge dépend du dialogue moléculaire établi entre les deux tels que les signaux émis par le macroparasite lui-même pour se développer et les effecteurs cellulaires et solubles mis en jeu par le système immunitaire de l'hôte.

I.1.14.1. Impact de la relation hôte/*E. granulosus* sur l'établissement de la parasitose

Il est cependant clair que le succès de l'établissement de l'infection parasitaire dépendrait de la capacité du métacestode à contrecarrer le système de défense de l'hôte. Ceci dépendrait essentiellement des molécules exposées par le macroparasite à l'hôte qui l'héberge. Il s'agit essentiellement des molécules exposées à la surface de la membrane germinative ainsi que les protéines excrétées/sécrétées dans le liquide hydatique par la membrane germinative et par les protoscolex (Virginio *et al.*, 2007; Siracusano *et al.*, 2008a).

E. granulosus modulerait les mécanismes du système immunitaire de l'hôte en sécrétant des molécules diverses lui permettant de persister plus longtemps au niveau de son hôte intermédiaire (Maizels et Yazdanbakhsh, 2003, Hewitson *et al.*, 2009). La modulation du système immunitaire s'effectue grâce à la sécrétion et l'excrétion de molécules qui dégradent ou se lient ou interagissent d'une manière ou d'une autre avec les effecteurs solubles ou cellulaires du système immunitaire (Hewitson *et al.*, 2009). De plus, les produits sécrétés et excrétés par la larve hydatique pourraient interférer avec des processus de l'interaction hôte/parasite comme la dégradation de la matrice extracellulaire qui lui permet sa croissance ainsi que son extension progressive au niveau tissulaire. Ils peuvent aussi protéger le parasite contre les altérations oxydatives (Zeghir-Bouteldja *et al.*, 2009, 2013). La caractérisation de ces produits pourrait aider à la compréhension des mécanismes moléculaires et des stratégies adoptées par le macroparasite en faveur de sa persistance au niveau de son hôte (Amri et Touil-Boukoffa, 2015).

1.1.14.2. Le pouvoir antigénique de l'hydatide

Le pouvoir antigénique de la larve hydatique est lié essentiellement à sa richesse en protéines d'origine parasitaire et de l'hôte (**Khuroo et al., 2002**). Les antigènes de l'hydatide sont constitués des éléments figurés de la larve hydatique tels que les protoscolex et les antigènes des membranes kystiques (la membrane germinative et la couche laminaire) mais également les antigènes solubles dans le liquide hydatique. Ce dernier est composé des produits d'excrétion et de sécrétion de la membrane germinative et des protoscolex. Plusieurs antigènes ont été caractérisés au niveau des différents stades de développement du parasite (le ver adulte et ses produits de sécrétion), le stade larvaire (liquide hydatique, membranes kystiques) ainsi que le protoscolex. L'analyse protéomique des extraits de protoscolex combinée au western blot ont permis un screening de l'immunoréactivité de ses antigènes identifiés (**Zong Ji et Wei, 2012**). D'autres études ont été entreprises sur la caractérisation des antigènes des PES du protoscolex.

Un nombre d'antigènes de nature glycoprotéique sont produits par le metacestode *d'E granulosus* et sont utilisés pour la détection des anticorps dans les sérums des patients. Nous pouvons citer les deux molécules majeures: L'antigène B (AgB) et l'antigène 5 (Ag5). Ces antigènes ont été largement étudiés et utilisés en raison de leur haut pouvoir antigénique et de leur potentiel considérable dans l'interaction hôte/parasite.

-L'antigène 5 (Ag5) est une glycoprotéine thermolabile dimérique de 400kDa composée de deux sous unités de 22 et 38 kDa liées par un pont di-sulfure. La sous unité 38 kDa est associée à une sérine protéase de la famille des trypsines (**Lorenzo et al., 2003**). C'est un antigène dominant dans le liquide hydatique. Il est exprimé au niveau de tous les stades du cycle de vie du parasite. Une réactivité croisée a été démontrée entre l'Ag5 et d'autres parasites tels qu'*E. multilocularis* ainsi que d'autres helminthes indiquant sa faible spécificité (**Shepherd et McManus, 1987**).

-L'Antigène B (AgB) est une lipoprotéine thermostable de 150kDa sécrétée par le stade larvaire d'*E. granulosus*. Elle est caractérisée par son importance dans la biologie du parasite et son interaction avec l'hôte. Ces antigènes ont été caractérisés par SDS-PAGE et immunoblotting (**Hamrioui et al., 1986; Shepherd et McManus 1987; Al Yaman et Knobloch, 1989; Lightowers et al., 1989; Shapiro et al., 1992; Touil-Boukoffa, 1998; Mezioug, 2002; Zhang et al., 2003; Amri et al., 2005**). Actuellement, les stratégies

d'immuno-protéomique utilisées suggèrent l'existence d'un profil de sécrétion semblable à celui des sous unités secrétées par la membrane germinative ainsi les antigènes présents dans le liquide hydatique sont produits majoritairement par la membrane germinative. Il a été décrit que l'AgB et l'Ag5 sont impliqués dans différents mécanismes de l'interaction hôte/parasite permettant l'établissement de l'infection et la survie du parasite au sein de son hôte intermédiaire par inhibition des protéases et par immunomodulation (**Shepherd et al., 1991; Rigano et al., 2001; Siracusano et al., 2008b**).

-Les autres antigènes

Des recherches se sont basées sur l'identification d'autres antigènes doués d'un potentiel diagnostique et qui pourraient constituer des candidats pour de nouveaux vaccins. Cependant, leur expression est variable et instable selon les différents stades de développement du parasite. Dans ce contexte, plusieurs travaux rapportés soulignent la variabilité antigénique de l'hydatide et la présence de plusieurs antigènes en plus de l'antigène B et l'antigène 5. Dans la même optique, des équipes de recherche ont identifié et caractérisé d'autres composantes antigéniques du kyste hydatique tel que EgEF-1 β/δ , EA21, et Eg HSP70 associées à des troubles allergiques dues à l'échinococcose (**Margutti et al., 1999; Ortona et al., 2003; Siracusano et al., 2012a**). Une base de données d'épitopes d'*E. granulosus* a été établie. Certains épitopes ont été utilisés pour l'immunisation de souris induisant une forte production de l'interferon- γ ainsi cette immunisation serait en faveur de l'induction de la voie Th1 favorisant l'élimination du parasite (**Esmaelizad et al., 2013**).

-Avancées récentes sur l'étude des épitopes d'E. granulosus

L'avancée des technologies et de la bioinformatique a permis de laisser entrevoir une évolution dans l'étude des réponses immunitaires. Actuellement des bases de données ont été établies, elles sont basées sur les prédictions des épitopes B et des épitopes T pour l'étude des réponses immunitaires engagées lors de l'échinococcose. De même, l'analyse structurale fine de ces antigènes permettrait de mettre en exergue les épitopes B et les épitopes T fonctionnels ayant un potentiel important dans le développement de vaccins (**Pan et al., 2017**).

1.1.14.3. La réponse immunitaire vis-à-vis d'E. granulosus

-La production des cytokines

Au cours de l'hydatidose, plusieurs voies cytokiniques sont engagées. Des taux élevés d'IL-4, d'IL-5, d'IL-6, et d'IFN- γ sont produits *in vitro* par les PBMCs isolés à partir de patients hydatiques et stimulés par les antigènes du liquide hydatique (**Touil-Boukoffa, et al.,**

1997, 1998; Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009; 2012). Des taux élevés de cytokines ont été également détectés dans les sérums de patients hydatiques (Touil-Boukoffa, et al., 1997, 1998; Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009; Amri et al., 2009). La coexistence de l'IL-10 et de l'IFN- γ à des taux élevés suggèrent que la réponse immunitaire au cours de l'hydatidose est régulée par les deux voies Th1 et Th2 (Amri et al., 2007, Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009; Amri et al., 2009). Ces données sont associées à la complexité antigénique du liquide hydatique exprimant des épitopes distincts pour chaque population de cellules T. L'augmentation des taux de l'IL-6, l'IFN- γ et de l'IL-17A observée dans le sérum de patients atteints d'hydatidose avant et après la chirurgie, suggère l'implication de ces cytokines dans les mécanismes de défense de l'hôte contre l'infection parasitaire (Mezioug et Touil-Boukoffa, 2012).

Le TGF- β et l'IL-10, sont induites par différentes molécules ou composants du kyste hydatique, de sorte que l'AgB pourrait induire la production du TGF- β , alors que les composants du protoscolex, autre que l'AgB et l'Ag5, pourraient induire la sécrétion de l'IL-10 (Haniloo et al., 2008; Amri et Touil-Boukoffa, 2015).

À travers des études antérieures rapportées par notre équipe, il a été démontré l'implication de la voie IFN γ /NOS2 (Amri et Touil-Boukoffa et al., 2015). L'expression de la NOS2 a été détectée dans des biopsies de foie de patients infectés par le kyste hydatique (Ait Aissa et al., 2006). Le rôle actif du NO dans la réponse immunitaire vis-à-vis d'*E. granulosus* fait suite à l'induction de la NOS2 par les cytokines de la voie Th1 (Touil-Boukoffa et al., 1998, Amri et al., 2007; Zeghir-Bouteldja et al., 2009). Toutefois, il est important de souligner que l'effet des nitrites *in vitro* est dégénératif sur l'hydatide mais les observations *in vivo* montrent l'inefficacité de ses métabolites. Ces données seraient en faveur de l'engagement d'un mécanisme antagoniste permettant la protection des parasites des effets du monoxyde d'azote (NO) (Zeghir-Bouteldja et al., 2009).

-La production des anticorps au cours de l'échinococcose kystique

Au cours de l'hydatidose kystique humaine, la production des IgEs et IgGs dirigés contre les antigènes du liquide hydatique est prédominante. Les sous-classes d'IgGs reconnaissent différents antigènes du liquide hydatique. Cependant, l'IgG1 reconnaît préférentiellement l'Ag5 alors que l'IgG4 reconnaît l'Ag B (Ioppolo et al., 1996; Daeki et al., 2000).

La différence dans la classe des immunoglobulines est variable selon le statut clinique des patients (asymptomatique, hydatidose compliquée, statut clinique post-chirurgical) (Aceti

et al., 1993; Khabiri *et al.*, 2006). L'IgG4 serait associé à la croissance du kyste hydatique et à la progression de la maladie. En effet, il est considéré actuellement comme un marqueur immunologique au cours de l'échinococcose kystique. L'IgG4 est une sous-classe associée à une infection chronique, car elle n'a pas d'activité cytophilique et n'entraîne pas la fixation du complément (Aceti *et al.*, 1993; Garraud *et al.*, 2003). Cependant, il a été rapporté l'existence d'un récepteur au niveau de la surface du protoscolex liant le fragment Fc des IgG1 et IgG3. Ce récepteur permettrait au protoscolex de se lier et de cliver ces immunoglobulines nécessaires probablement à sa nutrition ou à masquer ses antigènes afin d'échapper au système immunitaire (Baz *et al.*, 1998). Il faut noter que la production des différentes immunoglobulines est tributaire des cytokines produites.

-Rôle des antigènes dans l'immunomodulation

Plusieurs molécules sécrétées contribuent à la régulation du système immunitaire suite à l'instauration de la pathologie. Les protéines tégumentaires induisent la voie Th2 qui est associée à l'infection chronique. Les protéines 14-3-3 sont associées à la résistance à la réaction immunitaire locale. Cependant la famille de l'antigène B est impliquée dans le mécanisme d'évasion car cet antigène est produit à différentes quantités. Il a été rapporté que les cystéines protéases inhibent la voie Th1 via l'induction de la production de l'IL-4.

Le mécanisme d'échappement déployé par le macroparasite est fort régulé par la voie Th2 et Treg. Dans ce contexte, les travaux de notre équipe menés *in vitro* ont montré que l'IL-4 et l'IL-10 réduiraient l'effet scolicide. Cette réduction est corrélée avec la réduction de la production du NO par les PBMCs en coculture avec les protoscolex (**Tableau 3**). D'autre part, la voie IL-10/Arginase semble être impliquée dans les mécanismes d'échappement du parasite. Il a été montré que les activités NOS2 et NADPH oxydase sont inhibées par la couche laminaire. Cet effet serait associé à une stimulation de l'activité de l'arginase (Amri *et al.*, 2012, 2015).

Tableau 3: Effet immunorégulateur *in vitro* et *in vivo* d'*E. granulosus* sur la réponse immunitaire chez l'homme (Touil-Boukoffa et al., 1997, 1998; Vuitton, 2004; Amri et al., 2007, 2009; Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009; Siracusano et al., 2012a).

Antigène	Population cellulaire	Action	Effets
AgB, EgTeg	Neutrophiles	Inhibition du chimiotactisme Réduction de l'H ₂ O ₂	Echappement au système immunitaire
AgB	Monocytes	Bloque la différenciation (CD1a)	Echappement au système immunitaire
AgB	Les cellules dendritiques immatures	Augmentation de la production de l'IL-10, IL-6 et TNF- α Pas de production de l'IL-12	--
EgEF-11 β/δ , EA21, Eg2Hsp70, (Liquide hydatique)	Lymphocytes T-helper Lymphocytes	Augmentation de la production de IL-4, IL-13 Faible production de l'IFN- γ Pas de production de l'IL-12	Immunomodulation: activation de la voie Th2
AgB, EgTeg, EgEF-1 1 β/δ , EA21, Eg19, EgTPx	Lymphocytes B	Production des IgG4 spécifiques	Echappement immunitaire: IgG4 non - cytophilique Absence d'activateurs du complément Bloque l'immunité médiée par les IgE
EgEF-11 β/δ , EA21	Lymphocytes B	Production des IgE Allergiques	Réaction allergique

I.2. Le monoxyde d'azote

Plusieurs travaux de recherche rapportent l'importance du rôle du radical NO dans des processus physiologiques très variés. La découverte du premier rôle biologique du monoxyde d'azote (NO) a été initiée par Ferid Murad en 1976. Sa découverte dans le système cardiovasculaire a valu le Prix Nobel de physiologie et de médecine en 1998 aux chercheurs Robert Furchgott, Louis J. Ignarro et Ferid Murad (**Furchgott et Zawadzki, 1980; Murad, 1986**).

I.2.1. Les propriétés physico-chimiques du monoxyde d'azote

Le NO est un radical libre et lipophile. Il diffuse librement à travers les membranes cellulaires. C'est une molécule labile qui diffuse depuis son site de synthèse et interagit avec les biomolécules. Ainsi, sa réactivité et son aptitude à la diffusion lui confèrent des propriétés particulières, dont les effets régulateurs s'exercent sur la plupart des fonctions physiologiques de l'organisme. Sa demi-vie *in vivo* est d'environ 10 secondes. Sa faible solubilité aqueuse conduit à la formation de nitrites (NO_2^-) et de nitrates (NO_3^-) dont le dosage permet d'évaluer la quantité de NO en solution. En solution aqueuse, le NO réagit rapidement avec l'oxygène formant le trioxyde d'azote (N_2O_3), rapidement décomposé en ion nitrosonium (NO^+) et nitrite.

Par ailleurs, il semble qu'il existe des formes de stockage endogène du NO tel que les S-nitrosothiols, notamment dans les vaisseaux sanguins (**Moncada et al., 1997**). Certaines métalloprotéines servent de transporteurs pour le NO. Le fer de l'hème peut lier le NO et il est capable de le libérer rapidement (**Stamler et al., 1992a**). Le NO peut réagir avec l'oxyhémoglobine conduisant à la formation de la méthémoglobine et du nitrate.

En effet, le NO peut réagir avec des protéines contenant des groupements thiols comme l'albumine formant ainsi des groupements S-nitrosothiols pouvant jouer un rôle de stockage ou de transport. Ainsi l'albumine permet la diffusion du NO *in vivo* (**Stamler et al., 1992a; Rafikova et al., 2002; Oett et Marsche, 2010**).

I.2.2. La biosynthèse du NO

I.2.2.1. Structure des NOSynthases

Toutes les isoformes de la NOSynthase (NOS) sont des protéines homodimériques, comprenant deux monomères de 160, 130 et 135 kDa chacun pour les NOS1, NOS2 et NOS3 respectivement (**Xu et Liu, 1998**). Elles sont actives sous forme de dimères. Chaque

monomère est constitué de deux domaines, l'un ayant une fonction réductase et l'autre, une fonction oxygénase (**Figure 8**).

-Le domaine oxygénase: C'est la partie N-terminale de la NOS. En plus de l'hème, le domaine oxygénase comporte les sites de liaison à la L-Arginine et à la tétrahydrobioptérine (BH4). C'est ce domaine qui permet la dimérisation des monomères de la NOS, sous le contrôle de la BH4 et de la L-Arginine, la BH4 participe de plus à la stabilité des dimères formés (**Klatt et al., 1995**).

-Le domaine réductase: C'est la partie C-terminale de la NOS, son rôle est d'assurer le transfert des électrons de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate sous forme réduite (NADPH) via les cofacteurs flavine adénine dinucléotide (FAD) et la flavine mononucléotide (FMN), vers le domaine oxygénase où se situe le site catalytique (**Bredt et al., 1990; Adak et al., 1999**).

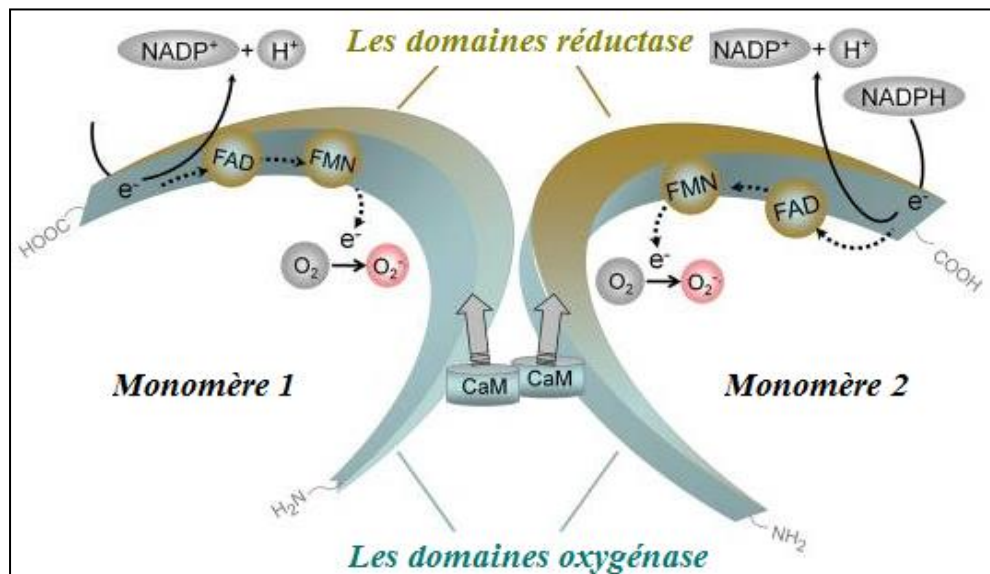


Figure 8: Structure des NO synthases (**Forstermann et Sessa, 2012**).

1.2.2.2. Le mécanisme catalytique de la biosynthèse du NO

Tous les isoformes libèrent le NO par la conversion de la L-arginine en citrulline (**Hemmens et Mayer, 1998, Boggs et al., 2000**). L'oxygène moléculaire, le nicotinamide-adenine-dinucléotide phosphateréduit (NADPH) sont des cosubstrats. La Flavine adenine dinucléotide (FAD), la flavine mononucléotide (FMN), et le (6R-)5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH₄) sont des cofacteurs. L'atome de zinc interagit avec les crochets N-terminaux

et contribue à la stabilisation du dimère ainsi qu'à l'intégrité du site de fixation du co-facteur BH4.

La réaction de synthèse du NO peut être assimilée à deux réactions de monooxygénation. La première réaction consiste en l'oxydation de la L-Arginine. Cette réaction engendre un intermédiaire, la OH-L-Arginine, rapidement oxydée en L-Citrulline (**Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998**). Ces deux réactions d'oxygénation sont réalisées en parallèle avec la réduction d'une molécule et demi de NADPH en NADP⁺ (**Figure 9**).

Les électrons sont fournis par le NADPH, transférés sur les flavines et la calmoduline, puis présentés à l'hème: le centre catalytique. Le NADPH se fixe au domaine réductase des NOS par lequel il est oxydé. Les deux électrons ainsi libérés transitent par le FAD puis le FMN avant d'aboutir dans le domaine oxygénase, qui possède les sites de fixation de la BH4 et de l'hème. Ce flux d'électrons n'est possible que si la calmoduline est couplée à la protéine, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendante de la concentration en ions calcium (la calmoduline est fortement couplée à l'isoforme inductible).

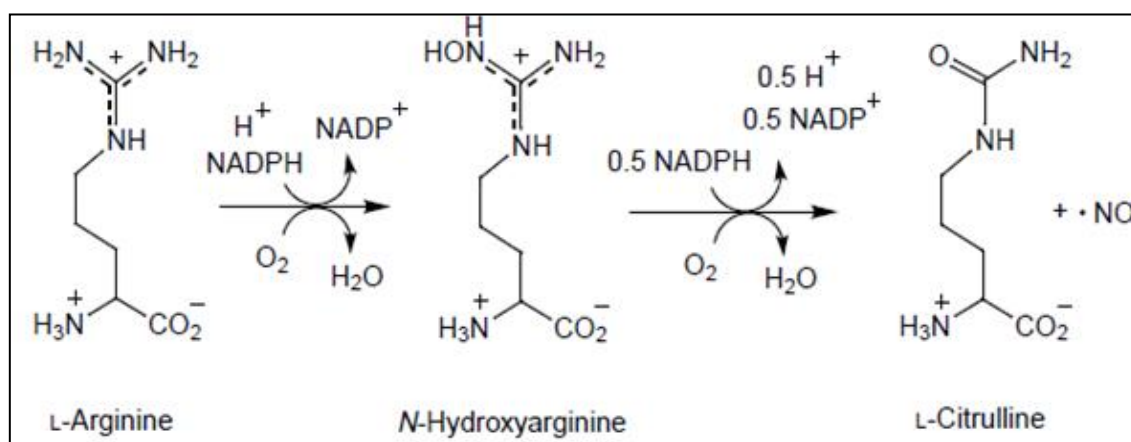


Figure 9: Les réactions de la synthèse du monoxyde d'azote (**Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998**).

Le flux d'électrons est également modulé par la présence du substrat, la L-arginine, qui l'accroît (NOS-2) ou l'inhibe (NOS-1) lorsqu'elle se fixe au site actif de l'enzyme. Le substrat est hydroxylé par l'hème du domaine oxygénase en NOHA grâce aux électrons provenant du NADPH et grâce à de l'oxygène moléculaire (**Figure 10**). La NOHA est oxydée à son tour, pour donner le NO et la citrulline. Cette double oxydation est inhibée par le NO, qui est capable de se fixer à l'atome de fer hémique (**Abu-Soud et Stuehr, 1993; Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998**).

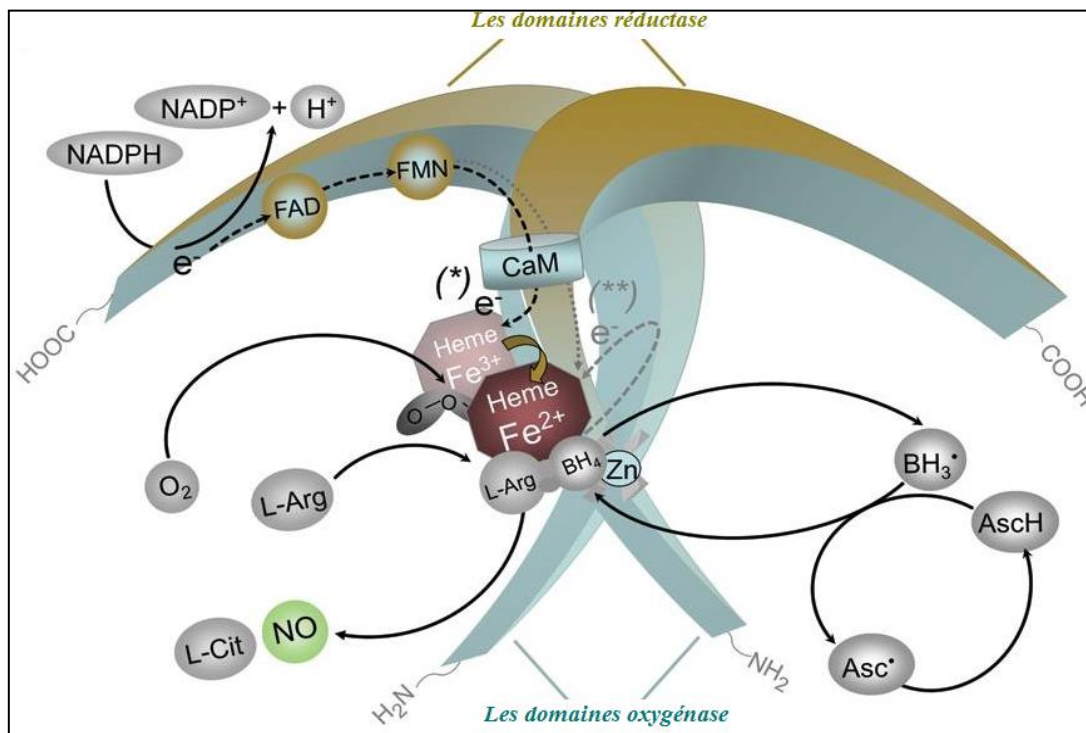


Figure 10: Le mécanisme catalytique des NOSynthases (Forstermann et Sesa, 2012).

I.2.3. Les isoformes des NOSynthases

Trois isoformes de NO synthases ont été identifiées, clonées et exprimées. Leur classification découle de leur ordre historique de purification. Elles sont codées par des gènes distincts. La NOS neuronale (NOSn ou type 1), la NOS endothéliale (NOSe ou type 3) et la NOS inducible (iNOS ou type 2). Les types 1 et 3 sont des isoformes constitutives, calcium dépendantes et produisant de faibles quantités de NO à l'état basal (de l'ordre de la picomole)(Mayer *et al.*, 1998). Le type 2 est une isoforme inducible, calcium indépendante et pouvant produire d'importantes quantités de NO (de l'ordre de la nanomole).

Récemment, une activité NOS a été mise en évidence dans plusieurs espèces bactériennes, y compris des agents pathogènes connus tels que *Bacillus anthracis* et *Staphylococcus aureus*. Cependant les différentes formes de la NO synthase ont été classées comme suit:

I.2.3.1. La NOSynthase neuronale (NOS1)

C'est la première isoforme de la NOS à avoir été isolée, en 1990, par **Bredt et Snyder (1990)**. La NOS1 est une enzyme cytosolique. Le gène codant pour cette isoforme est situé sur le chromosome 12. La NOS1 produit du NO dans le tissu nerveux. Elle joue un rôle dans

la communication cellulaire. Elle est associée à des membranes plasmiques. L'activité de la NOS1 peut être inhibée par le N-propyl-L-arginine (APM).

1.2.3.2. La NOSynthase inductible (NOS2)

Les NOSs endothéliale et neuronale ont en commun leurs modes d'expression et de régulation dont la forme inductible (iNOS) se démarque. Cette forme est essentiellement cytosolique, elle est localisée sur le chromosome 17 chez l'homme (**Tableau 4**). Elle a été clonée en premier lieu dans une lignée de macrophages stimulés par du LPS et de l'IFN- γ (**Drapier, 1997; Babuet Griffith, 1998; Bogdan et al., 2000**). Actuellement, elle a été décrite dans de nombreux types cellulaires tels que les pneumocytes de type 2, les fibroblastes pulmonaires et les cellules endothéliales. La NOS inductible a été décrite comme calcium insensible, probablement en raison de son interaction étroite avec la calmoduline (CaM) et le Ca^{2+} . Cette isoforme produit de grandes quantités de NO après stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (l'interleukine-1, le TNF- α et l'IFN- γ) (**Drapier, 1997; Touil-Boukoffa et al., 1998; Vila-Del Sol et al., 2007**).

1.2.3.3. La NOSynthase endothéliale (NOS3)

La NOS-3 est exprimée principalement dans les cellules endothéliales vasculaires sous forme cytosolique et surtout membranaire (**Kobzik et al., 1994**). Le gène codant pour la NOS est situé sur le chromosome 7. Elle est prédominante dans l'appareil de Golgi et les vésicules cytoplasmiques. La NOS-3 est associée à une cavéole un composant de la membrane plasmique des cellules environnantes, et les membranes des corps de Golgi dans les cellules. (**Mitchel et feron, 1997**). Elle interagit avec certaines protéines qui régulent son activité. En effet, il a été rapporté que la protéine Heat-shock protein 90 (hsp90) est associée à la NOS3 et semble jouer un rôle régulateur de l'activité de la NOS3 (**Garcia-Cardena et al., 1998**). Cette protéine chaperone aurait aussi un rôle indirect dans l'activité des NOS-1 et NOS-2 (**Bender et al., 1999; Ratovitski et al., 1999**). La NOS3 génère le NO dans les vaisseaux sanguins. elle est impliquée dans la régulation de la fonction vasculaire.

1.2.3.4. La NOSynthase mitochondriale (mit NOS)

Ce sont les travaux de **Giulvi et al., (1998)** qui ont mis en évidence l'existence de la NOSynthase dans les mitochondries. La mitochondrie produit le NO via la NOSynthase mitochondriale. Le NO produit régule la consommation de l'oxygène et le potentiel transmembranaire via une réaction réversible du cytochrome C oxidase (**Ghfourifar et Cadenas, 2005**).

Tableau 4: Les principales caractéristiques des NOS humaines (**Knowles et Moncada, 1994; Xu et Liu, 1998; Mayer, 1998; Drapier, 1997; Senequier et Vadon-Le Goff, 1998**).

	NOS1	NOS2	NOS3
Localisation chromosomique	12	17	7
Taille du gène	>200 kb	37kb	21 kb
Nombre d'exons	29	26	26
Taille de l'ARNm	8.5 - 9.5 kb	4.2 - 4.5 kb	4.3 - 4.8 kb
Nombre d'acides aminés	1434	1153	1294
Poids moléculaire	160	130	133
Localisation des isoformes	-Neurones, -cellules photoréceptrices -cellules épithéliales -Ilots de Langerhans -macula densa -épithélium columnaire -muqueuse gastrique	Macrophages, lymphocytes, Neutrophiles, ostéoblastes cellules de Kupffer, hépatocytes, cellules musculaires lisses, cellules macrogliales et microgliales plaquettes	Endothélium Cellules pyramidales Plaquettes, myocytes cellules épithéliales alvéolaires, cellules épithéliales tubulaires

I.2.4. Régulation de l'expression et de l'activité des NOSynthases

La régulation de la NOS est un processus qui se déroule à différents niveaux. La régulation des différentes isoformes de la NOS est d'origine transcriptionnelle. Dans ce sens, il a été rapporté que la production de NO par la NOS2 est corrélée avec les changements de la quantité de l'ARNm pour qu'une part majeure de la régulation de la NOS2 soit d'origine transcriptionnelle. Cependant, la régulation de la NOS2 peut être post transcriptionnelle et le défaut de substrat représenté par l'arginine est associé à une diminution de l'activité de la NOS2 (**Tadie et al., 2008**). De même, il semblerait que la nitration de cette dernière pourrait

être associée à une diminution de son activité, constituant ainsi un rétrocontrôle négatif (**Lanone et al., 2002**).

L'analyse du promoteur murin de la NOS2 a permis la mise en évidence de deux régions régulatrices, une sensible au LPS, l'autre à l'IFN- γ , au niveau du système respiratoire (**Lowenstein et al., 1993; Robbins et al., 1994**). Par ailleurs, le rôle de l'IFN- γ est crucial pour l'induction de la NOS2 dans les cellules épithéliales alvéolaires *in vitro* (**Drapier, 1997; Guo et al., 1997**).

La régulation de la NOS3 est transcriptionnelle et post transcriptionnelle (**Balligand et al., 2009**). La transcription de la NOS3 est sous le contrôle du NF κ B ou du facteur de transcription LKLF (lung Küpperlike factor). Foxo-1 agit comme un répresseur de la transcription de la NOS3 (**Potetnte et al., 2005**).

La phosphorylation de la sérine (Ser-1177) est un des mécanismes de régulation post-translationnelle les plus importants car elle augmente l'activité de la NOS3. De même, la NOS3 peut être inhibée par une production importante de NO. En effet, la nitrosylation de la NOS fonctionnelle induit sa monomérisation et son inactivation (**Ravi et al., 2004**). En réponse aux forces de frottement exercées par le flux sanguin, la NOS3 est phosphorylée par la kinase Akt (Ser1177 de la NOS3 humaine), ce qui a pour effet d'augmenter la production de NO (**Fulton et al., 1999; McCabe et al., 2000**).

Cependant d'autres protéines participent à la régulation de l'activité des NOSs, par interaction protéine-protéine. Ainsi, la protéine Heat-shock protein 90 joue un rôle régulateur de l'activité de la NOS3 via un mécanisme direct (**Garcia-Cardena et al., 1998**). Cette protéine chaperone aurait aussi un rôle indirect dans l'activité des NOS1 et NOS2 (**Bender et al., 1999; Ratovitski et al., 1999**). Il existe également d'autres protéines telle que la kariline (NOS2) ou la cavéoline (NOS1 et NOS3). L'interaction de la NOS-Interacting Protein (NOSIP) avec la NOS neuronale régule sa distribution ainsi que son activité (**Dreyer et al., 2004**).

I.2.5. Le rôle physiologique du monoxyde d'azote

Le rôle physiologique du NO s'inscrit dans des processus de signalisation (régulation de la pression artérielle, communication neuronale) et de cytotoxicité (réponse immunitaire non spécifique). Le NO est une molécule très réactive qui a des effets extrêmement variés dépendant essentiellement de la concentration du NO et du milieu environnant son site de synthèse.

Il est caractérisé par une dualité physiologique. Cependant, le NO est impliqué dans la voie de signalisation de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à travers la stimulation de la guanylate cyclase soluble et augmentation du GMPc.

Les effets du NO sont loin d'être univoques. Ceci résulte de la variété des cellules qui synthétisent le NO et des celles qui en sont la cible. Le NO est un important régulateur et médiateur de plusieurs fonctions physiologiques notamment la neurotransmission, les phénomènes de mémorisation, d'apprentissage, la vasodilatation, la régulation de la pression artériolaire et la régulation de la réponse immunitaire (**Moncada et Higgs 1991, 1995; Holscher, 1997; Drapier, 1997; Mungrue et Bredt, 2004**). Dans ce contexte, il faut souligner le rôle central du NO dans le fonctionnement du système immunitaire.

De plus, Il existe deux effets liés au NO, un effet direct du NO lui-même et un effet indirect, médié par les espèces réactives de l'azote (ERN) produites par l'interaction du NO avec l'anion superoxyde ou avec l'oxygène ainsi il peut influencer plusieurs processus physiologiques. Il faut également souligner que l'action du NO concerne également l'action du cation nitrosonium et l'anion nitroxyl (**Stamler et al., 1992b**).

I.2.6. Le rôle du NO dans la réponse immuno-inflammatoire

Le NO est un effecteur des réactions inflammatoires et immunologiques. Il a été initialement considéré comme un marqueur de l'inflammation. Il est produit par les macrophages (**Drapier, 1997; Taylor et Geller, 2000**), les neutrophiles (**Salvemini et al., 1989**), les cellules de Kuppfer, les lymphocytes et les hépatocytes stimulés par des cytokines tel que le TNF- α et l'IFN- γ pour produire les intermédiaires réactifs de l'azote (RNI) et les intermédiaires réactifs de l'oxygène (ROI) (**Nussler et al., 1992, Motard et al., 1993; Dugas et al., 1995; Burdon et al., 1996**). Le rôle de ces cellules est la destruction des cellules étrangères ou endommagées. Ce processus implique la production de grandes quantités de NO, ce dernier constitue un agent cytotatique et cytotoxique. Par ailleurs, le NO pourrait également être un agent anti-viral par inhibition de la multiplication des virus ou encore être responsable de l'activité cytotatique des macrophages sur les tumeurs (**Akaike et Maeda, 2000; MacMicking et al., 1997**).

Le NO joue également un rôle important au cours des processus pathologiques durant lesquels sa concentration augmente (choc septique, inflammation...). Le macrophage produit des médiateurs tel que les radicaux libres, ce sont des produits d'activation de la NADPH oxydase mais en outre il produit du NO après activation de la NO synthase inductible, qui de

plus réagit avec les radicaux libres pour former un intermédiaire hautement réactif qui est le peroxy-nitrite (**Figure 11**).

La NADPH oxydase est un système enzymatique présent à l'état inactif dans la membrane plasmique, il est acquis par le phagolysosome. Ce complexe réduit le dioxyde d'hydrogène grâce aux électrons issus du NADPH pour former l'anion superoxyde, composé radicalaire extrêmement réactif, il est converti en peroxyde d'hydrogène par la superoxyde dismutase. Les granulocytes neutrophiles possèdent une enzyme la myéloperoxydase (MPO) qui transforme H_2O_2 en acide hypochloreux.

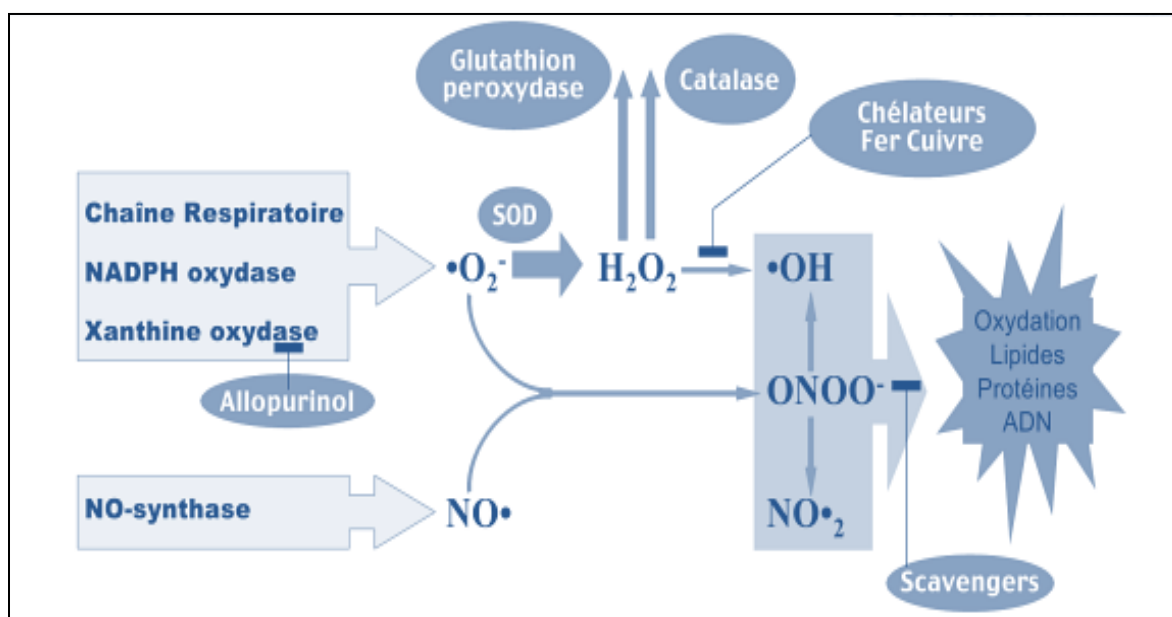


Figure 11: Implication de la NADPH oxydase et la NOsynthase dans la formation du peroxy-nitrite.

La réaction du NO avec l'oxygène moléculaire conduit à la formation du nitrogène dioxyde et le dinitrogène trioxyde (Ali et al., 2013).

La réaction du NO avec l'oxygène produit les composés N_2O_3 et N_2O_4 dégradés secondairement en nitrates et en nitrites. Une fois formé, le NO peut aussi évoluer vers des nitrites qui reflètent la production du monoxyde d'azote.

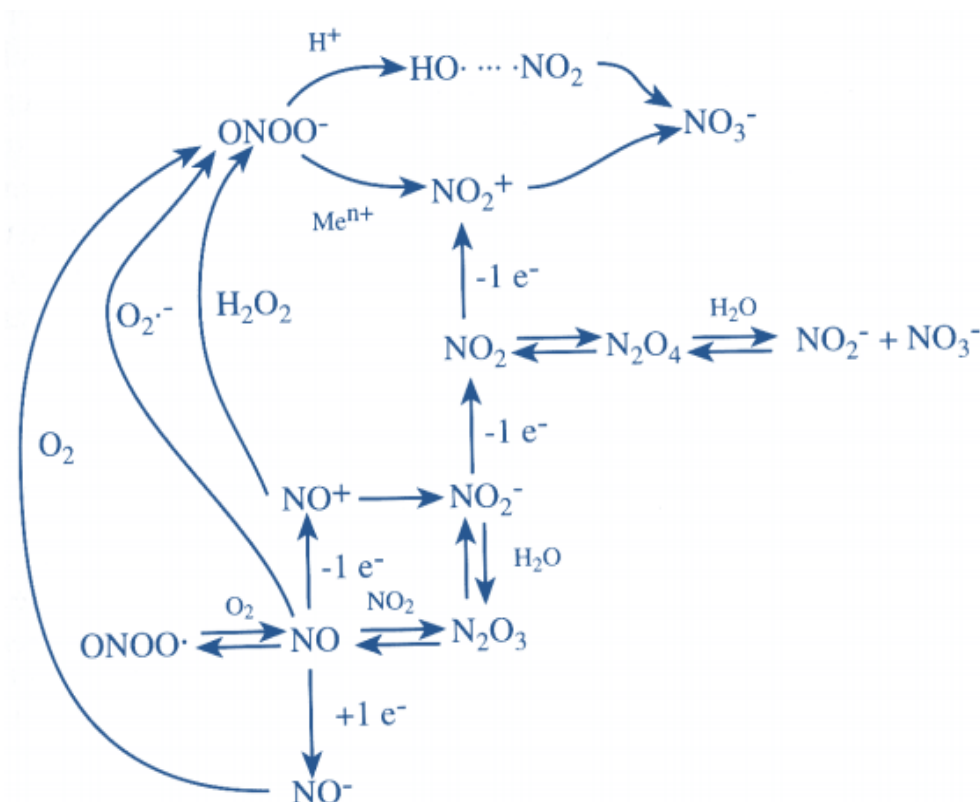


Figure 12: Le monoxyde d'azote et ses dérivés

I.2.7. La cytotoxicité du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote est doué d'effets potentiellement cytotoxiques mais cette cytotoxicité est également attribuée à ses produits d'oxydation (**Drapier et al., 1996; Halliwell et al., 1999; Patel et al., 1999, Pacher et al., 2007; Ali et al., 2013**). Dans les situations inflammatoires, la production simultanée du NO avec les anions superoxydes dans l'environnement cellulaire conduit à la formation du peroxyde nitrite (ONOO⁻). Cet anion est un puissant oxydant ayant pour cible la chaîne respiratoire de la mitochondrie, la membrane cellulaire, les protéines et l'ADN.

Le peroxyde nitrite formé *in vivo* peut conduire à des réactions d'oxydation, de nitration et de nitrosation conduisant à une toxicité, et une altération des fonctions cellulaires. Ainsi, il participe à la physiopathologie de nombreuses maladies. Avec les protéines, le peroxyde nitrite induit une nitration au niveau de la tyrosine pour produire de la 3-nitrotyrosine. La nitration de la tyrosine induit une modification de la structure et de la fonction des protéines. Cela dépend de la présence de l'ion superoxyde ainsi que l'activation de la NOS2. La dégradation du peroxyde nitrite conduit à la formation du radical hydroxyl (OH[·]) et le dioxyde d'azote (NO₂) qui réagit avec les résidus tyrosine des protéines.

Le NO peut réagir avec les thiols pour former les *S*-nitrosothiols *in vivo* comme le *S*-nitrosocysteine et le *S*-nitrosoglutathione (GSNO). Il est à l'origine de la nitrosylation des thiols. Le NO réagit avec l'oxyhémoglobine et relargue l'ion nitrosonium (NO⁺) qui est un radical libre très réactif. Avec les protéines, l'ion nitrosonium (NO⁺) induit une nitrosylation de la cystéine et de la méthionine. Il s'agit d'une modification protéique au cours de laquelle un groupe nitrosyl (R-N=O) est ajouté post-translotionnellement à la protéine. La *S*-nitrosylation est une réaction biologique importante du NO.

Le NO peut provoquer la nitrosation des protéines, des acides nucléiques. Il peut également conduire à la peroxydation des lipides. Cette réaction a surtout une importance au niveau des membranes biologiques dont elle augmente la perméabilité. Au niveau de l'ADN, la réaction de la guanine avec le peroxy-nitrite produit la 8 oxo-guanine impliquée dans les processus de mutagénèse et de carcinogénèse (Niles et al., 2006). L'importance des mécanismes d'autoxydation est dépendante de la concentration de NO et d'oxygène, entraînant une formation importante de N₂O₃ au site de synthèse de NO. Le peroxy-nitrite se décompose pour former l'anion hydroxyle (OH⁻) qui est un puissant oxydant. Il provoque des cassures des brins d'ADN ainsi que l'oxydation des acides gras (Pacher et al., 2007).

I.2.8. Le rôle du monoxyde d'azote dans la physiopathologie

Le monoxyde d'azote semble avoir un rôle majeur dans la physiopathologie car il est impliqué dans plusieurs maladies inflammatoires et autoimmunes (Belgundouz et al., 2011; Rafa et al., 2013; Soufli et al., 2016), il est caractérisé par une dualité d'effet (effet protecteur et toxique). Lorsqu'il est produit en excès par suite de la mise en jeu de la NOS inducible, son interaction avec l'anion superoxyde conduit à la formation d'un métabolite toxique. Le peroxy-nitrite semble être impliqué dans un grand nombre de processus cellulaires, dont l'apoptose et la nécrose (Virag et al., 2003). Il a été rapporté également qu'il est dans l'état normal, en permanence maintenu à des taux très faibles grâce au glutathion, par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase.

I.2.9. Le rôle du monoxyde d'azote dans la défense antiparasitaire

Le NO ainsi que ses métabolites stables ont été identifiés comme des effecteurs impliqués dans plusieurs infections parasitaires. C'est un médiateur cytotoxique et cytostatique vis-à-vis de divers parasites intracellulaires. Il a été rapporté que les macrophages activés sont capables de tuer de nombreuses espèces de *Leishmania* ainsi que *Schistosoma*

spapar la production du NO et ses dérivés (Mellouk et al., 1991). Il a été démontré que le NO est produit au cours de certaines parasitoses par les cellules de l'hôte.

Le rôle antiparasitaire de ce radical et de ses dérivés réactifs *in vivo*, *in vitro* a été démontré contre un nombre de parasites telque *Plasmodium sp.*, *Leishmania sp.*, *Toxoplasma gondii*, *Schistosoma sp.* and *Trypanosoma brucei* (Motard et al., 1993; Clark et al., 1996; Roitt et al., 1998; Belkhef-Slimani et Djerdjouri, 2017). Le NO montre un effet antiparasitaire sur les métazoaires chez l'hôte définitif et l'hôte intermédiaire (Ascenzi et al., 2002). La mise en évidence de fortes concentrations de nitrites dans les sérums de patients atteints d'hydatidose ou de schistosomiase a montré son implication dans la réponse antiparasitaire (Abo-Shousha et al., 1999; Touil et al., 1998; Aitaissa et al., 2006; Amri et al., 2007; Zeghir-Bouteldja et al., 2013). Les mêmes observations ont été rapportées au cours de l'infection par *E. multilocularis* (Kanazawa et al., 1993; Li et al., 2003). De plus, l'expression de la NOS2 a été observée au niveau des biopsies de foie de patients atteints d'hydatidose (Ait Aissa et al., 2006). Il a été rapporté que le NO est produit durant les différents stades du cycle biologique de certains parasites. Des études ont été menées notamment sur les effets des antigènes parasitaires sur la production du NO. Cependant, la NOS ou les produits de l'activité de ses isoformes (nitrite ou nitrotyrosine) ont été détectés dans différentes localisations au niveau de certains vers adultes. En effet, la NOS neuronale a été détectée dans le tissu nerveux de *Schistosoma mansoni* (Kohn et al., 2001). La NOS a été également été détectée chez le nématode *Ascaris suum* (Bascal et al., 1995, 2001) *Toxocara canis* (Fan et al., 2004; Muro et P'erez-Arellano, 2010).

I.2.10. Les mécanismes d'évasion déployés par les parasites vis-à-vis du NO

Plusieurs parasites utilisent les cellules de l'hôte à leur profit afin d'échapper à la destruction par les cellules effectrices du système immunitaire. Cependant, certains parasites provoquent une réponse immunitaire inefficace en inhibant ou en modulant la réponse immunitaire protectrice comme dans le cas de l'inhibition de la voie Th1 par la production de cytokines antagonistes tels que l'IL-4, l'IL-10, et/ou le TGF- β (James, 1995; Amri et al., 2007; 2009; 2015).

I.3. Apport de la protéomique

La protéomique est une approche technologique utilisée pour une meilleure compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques. Aujourd'hui en plein essor, elle a pour but d'étudier l'ensemble des protéines, produites par un organisme sous différentes conditions. Il apparaît indispensable d'étudier le «protéome» dans tous ces contextes. Le terme «protéome» est issu de la fusion des mots «protéine » et «génom». Ce terme a été prononcé pour la première fois en 1994 par Marc Wilkins lors de la 4^{ème} rencontre à Sienne en Italie portant sur les gels d'électrophorèse bidimensionnels (**Wilkins et al., 1996**).

I.3.1. Les outils de l'analyse protéomique

L'analyse protéomique est définie comme étant l'analyse globale des protéines caractérisées par leurs interactions, leurs modifications et les différentes isoformes exprimées dans la cellule (**Tyres et Mann, 2003**).

Un même génome peut orienter vers des transcriptomes et des protéomes différents en fonction des étapes du cycle cellulaire ou de la différenciation, de la réponse à des signaux biologiques ou physiques, et de l'état physiopathologique de la cellule (**Hochstrasser, 1997; Lottspeich, 1999**). En effet, le protéome reflète les répercussions des événements cellulaires au niveau tant traductionnel que post-traductionnel. De ce point de vue, seule une analyse protéomique directe peut donner une image globale des systèmes biomoléculaires dans leur complexité. Les méthodologies mises en œuvre pour l'analyse du protéome reposent principalement sur les techniques de séparation et d'analyse des protéines ainsi que l'analyse d'image et enfin la bioinformatique (**Kellner, 2000**).

I.3.1.1. La recherche des protéines d'intérêt par analyse d'image

Il s'agit, en effet, d'identifier sur les gels, les taches protéiques qui, d'un type d'échantillon à l'autre, sont inhibées (disparitions), induites (apparitions) ou bien encore changent de niveau d'expression entre les deux échantillons, de façon significative et pour des raisons biologiques. Une fois ces taches d'intérêt sélectionnées, il est nécessaire d'identifier les protéines qu'elles contiennent par spectrométrie de masse.

La caractérisation des taches ("spots") protéiques est une étape essentielle de l'analyse protéomique. Elle permet de passer de la simple description des variations observées sur les cartes protéiques (des taches apparaissent, disparaissent ou varient d'intensité) à une véritable interprétation: rattacher une tache protéique à une protéine déjà répertoriée dans les banques

de données c'est lui attribuer une (ou des) fonction(s), l'associer à une famille de protéines, à un (ou des) lieu(x) d'expression dans la cellule ou le tissu, l'inclure dans une chaîne réactionnelle. La caractérisation des taches protéiques présente un intérêt primordial, tant sur la plan fondamental et appliqué.

1.3.1.2. Identification des protéines par spectrométrie de masse (SM)

La spectrométrie de masse est une méthode analytique qui permet de déterminer la masse moléculaire précise combinée à la bioinformatique. La spectrométrie de masse (SM) est l'outil indispensable pour la détermination à très faible quantité de la séquence des protéines en mesurant son rapport massesur charge (m/z). L'identification par SM repose sur une mesure précise de la masse des peptides ionisés. Un spectromètre de masse est composé de trois modules:

- Une source d'ionisation;
- Un analyseur de masse qui sépare les ions selon leur rapport masse sur charge (m/z);
- Un détecteur de courant d'ions qui donne l'intensité des ions de chaque espèce
(Figure 13).

Les analyseurs utilisés pour l'étude du protéome sont de deux types. Le TOF (Time Of Flight) qui mesure le temps de vol des ions pour arriver au détecteur. Principalement utilisé avec le MALDI, cet analyseur permet d'avoir de très hautes résolutions. Le second type d'analyseur est le quadripôle. Les molécules à analyser sont dans un premier temps ionisées et amenées en phase gazeuse au niveau de la source. Les ions ainsi formés sont ensuite focalisés et transmis à l'analyseur où ils sont séparés en fonction de leur rapport m/z , qui leur confère un comportement différent au sein d'un champ électrostatique ou électromagnétique **(Aebersold et Mann, 2003)**. Ils sont enfin collectés par le détecteur qui quantifie leur intensité et amplifie le signal. Ces dernières étapes se déroulent dans un vide poussé afin d'éviter toute collision entre les ions et les molécules de gaz. Après la détection, un système informatique effectue le traitement des données et génère un spectre de masse qui reflète la variation du courant ionique observé en fonction du rapport m/z et permet de déterminer la masse moléculaire des espèces ionisées. Le développement de deux méthodes d'ionisation douce a révolutionné l'analyse des molécules biologiques, en particulier des protéines et des peptides. Cette découverte a été récompensée en 2002 par un prix Nobel de chimie et a ainsi ouvert la voie à l'analyse protéomique par spectrométrie de masse. Les spectromètres de masse peuvent utiliser un analyseur pour simplement mesurer la masse d'une molécule mais peuvent également associer deux analyseurs (appareils hybrides) et ainsi offrir la possibilité

de réaliser de la MS/MS pour séquencer les molécules analysées en MS (spectrométrie de masse en tandem). Dans ce cas, après l'analyse MS par le premier analyseur, des ions spécifiques sont fragmentés dans la cellule de collision, et les masses des fragments résultants sont mesurées par le second analyseur (Baudin, 2015).

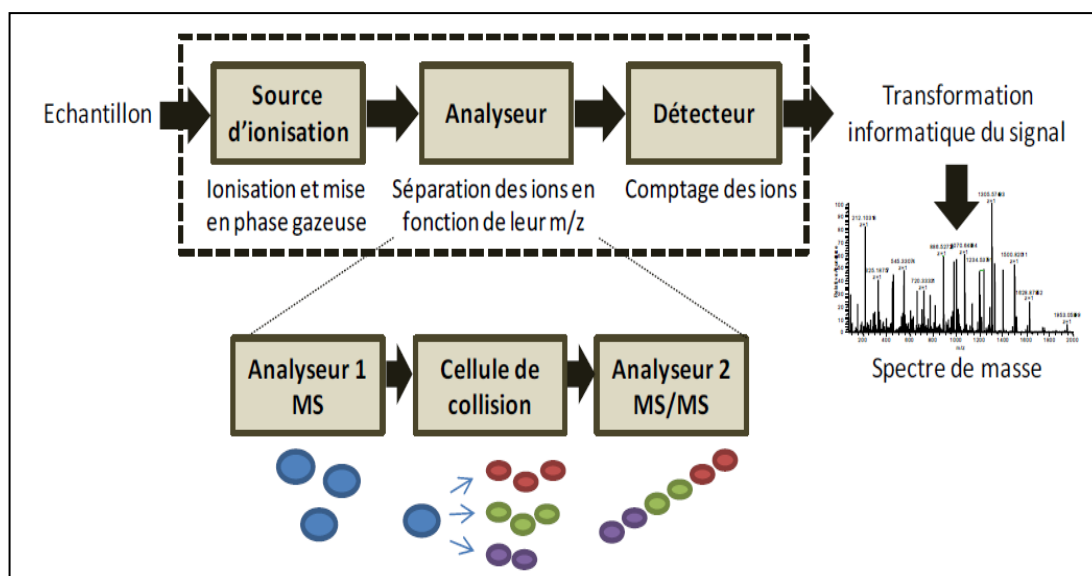


Figure 13: Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse.

1.3.1.3. La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

L'approche en chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (ou MS/MS) (Figure 14) représente une méthode largement répandue, dont l'efficacité a été démontrée dans de nombreuses études (Selbach et Mann, 2006; Geiger et al., 2011; Baudin, 2015).

Les protéines sont digérées par une endopeptidase le plus souvent la trypsine ensuite elles sont analysées par SM. Une des approches utilisée est l'établissement de cartes peptidiques massiques (peptide mass fingerprinting). La masse des peptides obtenus après digestion protéasique est comparée aux cartes de masses théoriques des protéines répertoriées dans les banques de données. Lorsque les échantillons sont trop complexes (exemple : cultures cellulaires, fluides biologiques), on utilise la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Dans ce cas, certains fragments peptidiques analysés lors d'une première SM sont choisis et fragmentés. Les pics de masse obtenus constituent une représentation de la séquence protéique, dans laquelle deux pics adjacents diffèrent par la masse d'un acide aminé perdu lors de la fragmentation du peptide analysé.

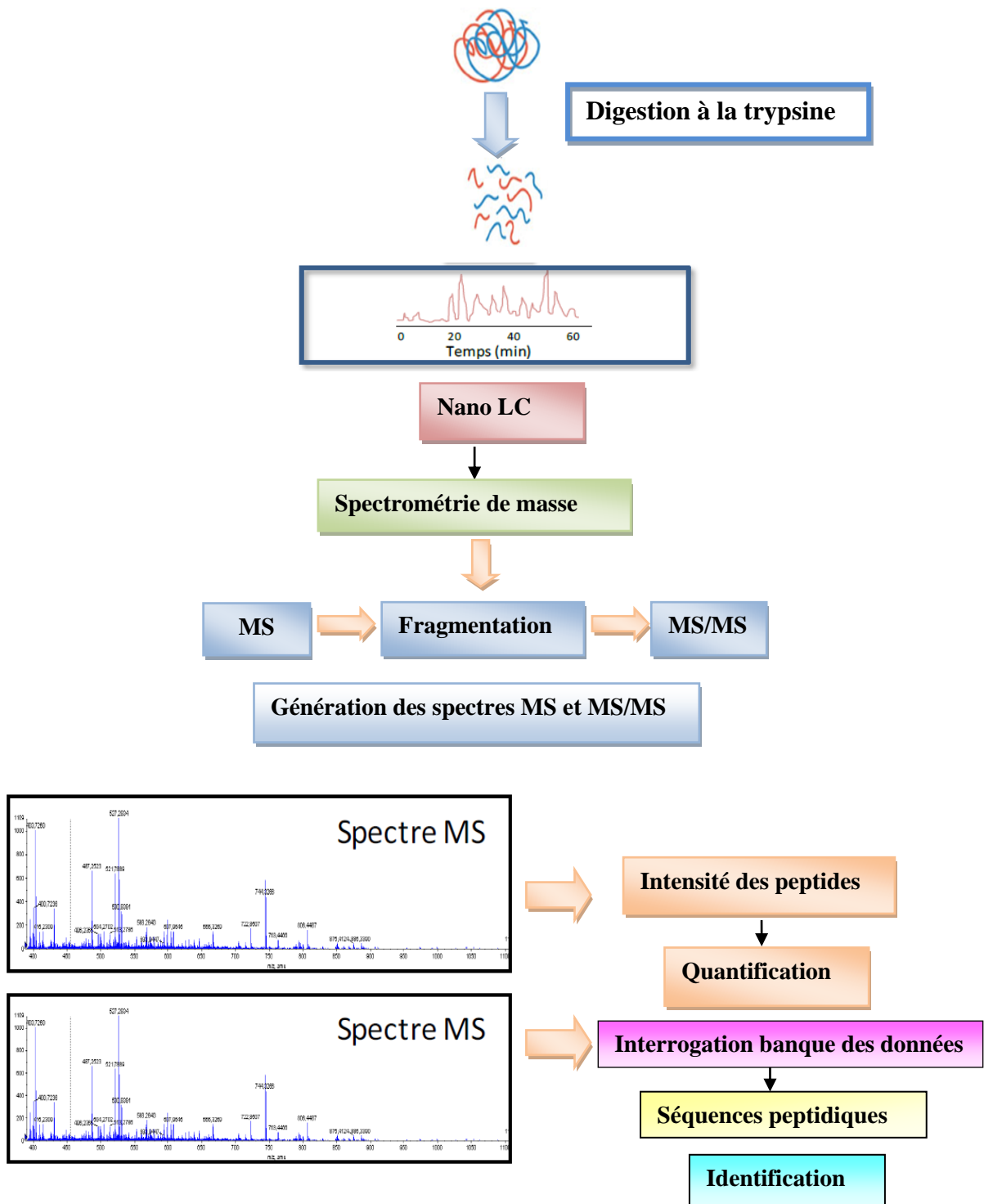


Figure 14: Stratégie générale l'analyse nanoLC-MS/MS.

1.3.1.4. Interrogation des bases de données

La dernière étape est l'interrogation des bases de données. La bioinformatique est un outil indispensable pour l'identification des protéines lors d'une analyse protéomique. On consulte les banques de données, telles que (Swiss-Prot ou nCBI...etc), avec des logiciels dédiés à l'identification des protéines (Sequest®, Mascot®, Peptide Search®, Prowl®, Protein Prospector®, MS-FIT®, Sequence retrieval system®). Les logiciels vont tout d'abord commencer par comparer la masse de la protéine étudiée aux masses des protéines des banques de données. Ceci permet de réduire dans un premier temps le nombre de candidats potentiels à l'identification. Si la protéine n'est pas identifiée, on réalise la comparaison avec les masses des peptides issus de la digestion trypsique. Si un doute persiste sur l'identification, un séquençage par MS/MS permettra d'enlever toute ambiguïté (**Kellner, 2000**).

1.3.2. Intérêt de la bioinformatique dans l'analyse protéomique

L'identification des protéines n'est pas le seul intérêt de la bioinformatique. Cette dernière est informative et utile tant sur le plan fondamental que clinique. Les différentes informations récoltées sur les protéines (masse apparente, masse réelle, point isoélectrique, taille des fragments après digestion enzymatique, séquences partielles) sont comparées aux bases de données génomiques ou protéomiques en ligne (site web). Les logiciels fournissent alors une liste de protéines et leurs probabilités associées. Seuls certains organismes, dénommés organismes modèles, ont leurs génomes complètement séquencés et disponibles en ligne. Dans le cas contraire, les organismes sont étudiés par homologie avec les organismes connus.

1.3.3. Les domaines d'applications de la protéomique

La protéomique s'impose comme un outil prometteur de l'exploration biologique puisqu'elle est susceptible de rendre compte des modifications de la composition des fluides biologiques en réponse, par exemple, à un processus pathologique. Les domaines d'application de la protéomique sont très variés. En biologie fondamentale, elle permet une meilleure compréhension de la physiologie, la physiopathologie des cellules et la régulation sous l'influence de différents stimuli. Elle permet également, le développement de nouveaux stratagèmes diagnostiques ainsi que le développement de nouvelles approches thérapeutiques (**Baudin et Bruneel, 2004; Baudin, 2015**). Ainsi, la recherche de nouveaux biomarqueurs permet de dépister des maladies, de suivre leur évolution.

L'analyse protéomique permet également de caractériser des protéines spécifiques d'une souche ou d'une espèce particulière.

Les modifications post-traductionnelles constituent un autre champ d'application très important au niveau du métabolisme des protéines et de leur régulation qui peut être explorée par l'analyse protéomique. La protéomique permet également de réaliser des analyses ciblées qui visent à quantifier une protéine d'intérêt dans différents échantillons, afin d'étudier son rôle dans un système biologique. Elle permet de valider l'intérêt d'un biomarqueur dont le niveau d'expression est corrélé à un état physiologique normal ou pathologique, ou encore à la réponse aux thérapies administrées.

I.3.4. Intérêt de l'analyse protéomique dans l'étude de l'échinococcose kystique

L'intérêt que l'on peut porter à l'étude du métacestode, est multiple, d'une part, elle permet d'avoir une image globale de l'interaction hôte/parasite et la compréhension de son fonctionnement afin de contrer et de diminuer l'impact de ce parasite suite à son installation au niveau de l'hôte. Cet intérêt est axé également sur la compréhension des enjeux moléculaires engagés par le système immunitaire de l'hôte confronté aux multiples molécules antigéniques ou à d'autres biomolécules stimulant la réponse innée (PAMPs).

Au cours de notre étude, l'analyse protéomique s'est essentiellement imposée dans l'étude de l'implication du NO dans l'échinococcose kystique visant à évaluer et identifier les répercussions de la production de ce radical au cours des différentes localisations de l'hydatidose.

En **2013**, **Zheng et al.**, séquençaient le génome d' *E. granulosus* permettant la révélation de nouveaux gènes dont les produits semblent être importants à la compréhension et à l'étude de la relation hôte/parasite ainsi que la perversion du système immunitaire. Des études post-génomiques entreprises se sont basées sur l'analyse protéomique. Toutefois, le répertoire protéique du kyste hydatique était restreint aux protéines antigéniques majoritaires. Récemment, la protéomique a significativement augmenté le nombre de protéines exprimées par *E. granulosus* au cours des différents stades de développement. **Chemale et al. (2003)** ont été les premiers à identifier les protéines du liquide hydatique et des protoscolex par la spectrométrie de masse. Ses travaux ont été complétés par **Monteiro et al. (2010)** qui ont identifié les protéines présentes dans les différentes composantes du kyste hydatique tel que le liquide hydatique, les protoscolex et la membrane germinative d'origine bovine. Récemment, les PES et des antigènes du ver adulte ont été caractérisés. Ces protéines semblent être impliquées dans l'interaction hôte/parasite (**Cui et al., 2013; Wang et al., 2015**).

Au début de notre travail, la composition protéique du liquide hydatique humain était relativement peu caractérisée. Une approche protéomique approfondie apparaît nécessaire afin de comprendre et d'identifier les événements moléculaires associés au caractère inoculable et évolutif de cette parasitose. Ces travaux ouvrent de nouvelles perspectives pour une meilleure connaissance de l'immunobiologie du parasite, et pour la définition de nouvelles cibles thérapeutiques. En parallèle, les études protéomiques à grande échelle permettraient d'identifier de nouvelles protéines synthétisées à différents stades de développement du parasite. Les résultats de ces études sont très prometteurs pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, prédictives, préventives ou vaccinales.

MATÉRIEL
ET
MÉTHODES

II. Matériel et méthodes

II. 1. Le matériel biologique

II.1.1. Les patients

a. Les patients hydatiques sélectionnés pour le dosage des nitrites

Le groupe de patients hydatiques algériens dont l'âge moyen est de $33 \pm 2,5$ ans avec une prédominance masculine (55% hommes) est composé de patients présentant des kystes hydatiques à différentes localisations anatomiques. Le diagnostic de l'hydatidose a été confirmé par radiologie et chirurgie. Le test d'haemagglutination a été utilisé pour la détection des anticorps. Ces patients ne présentent aucune autre pathologie.

Ces patients proviennent des différentes régions des hauts plateaux et des villes du nord-est, nord-centre et le centre algérien. L'anamnèse des patients a enregistré la présence de chiens dans leur entourage.

Ces patients ont fait l'objet de prélèvements sanguins pour le dosage des nitrites sériques avant et après chirurgie (1semaine avant et 24h-72h après chirurgie). Aucun patient n'a reçu un traitement pharmacologique avant la chirurgie. Les patients ayant d'autres pathologies chroniques ou infectieuses ou fumeurs ou alcooliques sont exclus de cette étude.

Le groupe de témoins qui a fait l'objet du dosage des nitrites est composé de 20 individus dont l'âge moyen est de 37 ± 6 ans, ce groupe est constitué de 10 hommes et 10 femmes ne présentant aucune pathologie inflammatoire ou infectieuse. Les examens de copro-parasitologie ont été effectués pour exclure toute affection parasitaire intestinale. Les échantillons sont obtenus du laboratoire de biologie clinique de Dely-Brahim et de l'institut Pasteur d'Alger, CHU de Bab-El Oued.

b. Les patients hydatiques sélectionnés pour l'analyse protéomique

Trois patients différents ont été sélectionnés pour l'analyse protéomique de leurs kystes hydatiques. Ces trois patients présentaient une infection primaire. Ils ont été admis au service de chirurgie thoracique de l'hôpital universitaire Mustapha Bacha d'Alger.

Le patient porteur du kyste hydatique pulmonaire souffrait de toux, de fièvre et de douleurs thoraciques. Le patient atteint d'hydatidose paravertébrale présentait des symptômes de paraplégie et d'ostéolyse au niveau de la région avoisinant le kyste hydatique. Les kystes pulmonaire et vertébral contenaient des liquides fertiles. Le liquide paravertébral était infertile. Les kystes hydatiques ont été obtenus après exérèse chirurgicale. Aucun patient n'a reçu de traitement médical avant chirurgie.

II.1.2. Le sang

Le sang est récolté par ponction veineuse au pli du coude dans des vacuténaires contenant de l'héparine. Il est récolté à partir de donneurs sains et de patients hydatiques. Les patients hydatiques ont été prélevés une semaine avant l'intervention chirurgicale et 24h - 72h après chirurgie.

Les échantillons de sérum sont répartis selon le statut clinique et l'état des kystes hydatiques des patients en différents groupes: Avant et après chirurgie (n=60), les patients récidivants après 18 mois de l'exérèse chirurgicale (n=15), localisation kystique (poumon n=24; foie n=32), état du kyste (kystes intacts et viables, n=56); kystes calcifiés (n=7); kystes rompus (n=4), double localisation (foie + poumons, n=6).

II.1.3. Les kystes hydatiques

Les kystes hydatiques ont été obtenus après exérèse chirurgicale en provenance de différentes localisations anatomiques (le foie, les poumons, la rate, l'os, le muscle, les vertèbres et la région paravertébrale). Les kystes hydatiques sont collectés dans des conditions stériles lavés au PBS pH 7,2 et conservés à +4°C.

II.1.4. Les liquides hydatiques

Après avoir récupéré les kystes hydatiques viables et intacts (ni rompus, ni fissurés, ni surinfectés). Ils sont rincés à l'eau physiologique et au PBS pH 7,2 stérile. Les liquides hydatiques sont collectés après ponction avec une aiguille très fine dans des conditions aseptiques. Ensuite ils sont récupérés dans des tubes stériles. Les échantillons sont centrifugés à 3,000 x g pendant 30 minutes à +4°C.

La fertilité des liquides hydatique était variable d'une localisation à une autre et même pour des kystes d'une même localisation anatomique. Dans ce sens ces liquides ont été classés en fonction de leur degré de fertilité, ainsi nous avons:

- ***Le liquide hydatique fertile (+)***: il est caractérisé par la présence d'un grand nombre de protoscolex et de vésicules filles. Il a un aspect laiteux et d'une couleur blanchâtre. Le nombre de protoscolex est supérieur à 1000 parasites/ml.
- ***Le liquide hydatique plus ou moins fertile (+/-)***: il est caractérisé par la présence d'un nombre réduit de protoscolex. il est clair et de couleur blanchâtre. Le nombre de protoscolex est inférieur à 500 parasites/ml.
- ***Le liquide hydatique infertile (-)***: il est caractérisé par l'absence totale des protoscolex et des vésicules filles. Le liquide hydatique est limpide.

D'une façon claire, les liquides hydatiques sont classés en plusieurs groupes. Leur classification est basée sur leur degré de fertilité et leur localisation anatomique: pour les localisations fréquentes nous avons: les liquides hydatiques hépatiques: LHHs (+) $n=13$; LHHs (+/-) $n=5$; LHHs (-) $n=7$; les liquides hydatiques pulmonaires: LHPs (+) $n=10$; LHPs (+/-) $n=4$; LHPs (-) $n=4$. Pour les localisations rares nous avons: le LH musculaire (-) $n=1$; LH splénique (+) $n=1$, LH pancréatique (-) $n=1$, LH vertébral (+) $n=1$; LH paravertébral (-) $n=1$.

II.1.5. Les biopsies

Les fragments tissulaires sont gracieusement fournis par le service d'anapathologie au CHU Lamine Debaghine de Bab Eloued. Les biopsies sont prélevées à partir du poumon de patients atteints d'hydatidose et sont conservées dans du formaldéhyde 4%.

II.1.6. La Souche bactérienne *Pseudomonas oleovorans* ATCC 8062

Il s'agit de la souche utilisée pour le dosage des nitrites totaux par la méthode du «Griess modifié», cette souche est douée d'une activité nitrate réductase et a été fournie par le Dr Jean-Claude Drapier (U365-Institut Curie –Paris).

II. 2. Le matériel non biologique

II.2.1. Le milieu de culture

Le milieu utilisé dans nos expériences est le milieu DMEM enrichie avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté à +56°C pendant 30minutes. Il est utilisé pour la culture des protoscolex et des membranes kystiques.

II.2.2. Les gels utilisés pour l'électrophorèse bidimensionnelle (2D)

Les gels utilisés comprennent des gels dits "home made" sont préparés au niveau de la plateforme de protéomique, laboratoire de microbiologie, département de biologie moléculaire, Université Libre de Bruxelles, royaume de Belgique. Les gels SERVA® sont utilisés pour le système "FlatTop Tower electrophoresis".

II.2.3. Les fluorophores: Les fluorophores utilisés au cours de notre étude sont le Cy3 et le Cy5 (Thermo Fisher Scientific®).

NB/ Tous les réactifs et solutions utilisés dans l'analyse protéomique sont préparés dans de l'eau milliQ.

II.3. Méthodes et techniques d'analyse

La démarche expérimentale suivie au cours de cette étude est résumée dans la **figure 15**.

II.3.1. Examen de fertilité des liquides hydatiques

La fertilité des kystes hydatiques est déterminée par la présence de protoscolex libres et viables dans le liquide hydatique. D'autres paramètres sont considérés pour la fertilité des kystes hydatiques tels que la blancheur de la membrane laminaire et la limpidité du liquide hydatique. Pour chaque kyste, quelques gouttes de liquide hydatique sont examinées sous le microscope pour vérifier la présence ou non de protoscolex. Tous les kystes qui contiennent du sable hydatique (protoscolex) sont considérés fertiles. Les kystes caractérisés par l'absence totale des protoscolex sont considérés stériles ou acéphalocystes.

Dans le cas d'un liquide fertile, le sable hydatique est récupéré dans des tubes stériles qui subiront une centrifugation à 3000 rpm pendant 30 minutes à +4°C, il se formera un culot contenant les protoscolex. Ainsi le liquide est récupéré pour subir des centrifugations successives afin de récupérer tout les protoscolex qui feront l'objet d'études le jour même pour une mise en culture et le liquide hydatique sera conservé à +4°C.

II.3.2. Test de viabilité des protoscolex

Ce test permet le suivi de l'évolution du taux de viabilité des protoscolex en fonction du temps. La viabilité des protoscolex est déterminée par observation sous microscope à phase inversée de leur mobilité et par test d'exclusion des colorants vitaux: le bleu de méthylène 0,1% ou l'éosine 0,1%. Les protoscolex vivants apparaissent réfringents sous microscope photonique et les protoscolex morts adopteront la coloration utilisée. On procède alors, à un comptage des protoscolex sous microscope au grossissement GX10 et par champs, dans un volume de 50 µl de la suspension de protoscolex après lavage avec du PBS pH 7,2.

Le taux de viabilité est déterminé par comptage des protoscolex morts par rapport au nombre total des protoscolex déposés entre lame et lamelle.

$$\text{Taux de protoscolex mort} = n \times 100/N$$

N: nombre total de protoscolex

n: nombre de protoscolex morts

$$\text{Taux de viabilité (\%)} = 100\% - \text{taux de protoscolex morts}$$

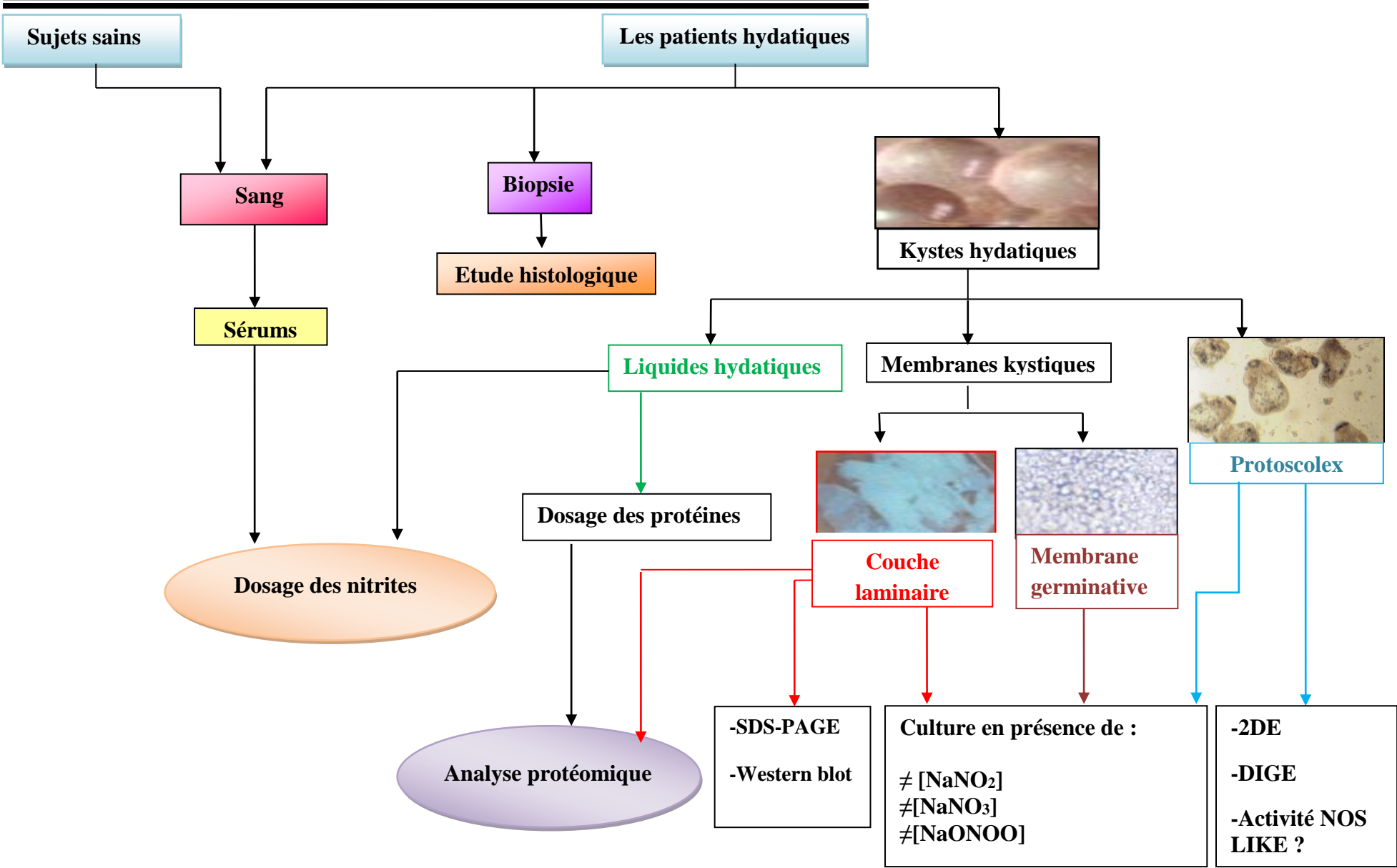


Figure 15: Démarche expérimentale

II.3.3. Dosage des nitrites par la méthode de GRIESS Modifiée

La production du NO est évaluée dans les sérums de patients, dans les liquides hydatiques ainsi que dans les surnageants de cultures de protoscolex. La production de NO est estimée par dosage des produits de son oxydation en nitrites et nitrates. La concentration des nitrites totaux ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) est déterminée par la méthode de Griess modifiée. Les nitrites sont dosés après la réduction des nitrates (NO_3^-) en nitrites par la nitrate réductase contenue dans la souche bactérienne *Pseudomonas oléovarans* (ATCC 8062) (Unité 365- Institut Curie Paris).

La réaction de Griess est basée sur deux étapes de réaction de diazotation dans laquelle le NO_2^- acidifié produit un agent nitrosant qui réagit avec l'acide sulfanilique conduisant à la formation de l'ion diazonium. Cet ion est couplé au N-(1-naphthyl) éthylène diamine pour former un azo-dérivé chromophorique (Miles et al., 1996). Un volume de 100 μl d'échantillon est mélangé avec 50 μl de 1/10 de la dilution de la suspension bactérienne. Après incubation à 37°C pendant 90 minutes. Plus de 90% de (NO_3^-) est transformé en (NO_2^-). Les échantillons sont centrifugés puis mélangés avec 100 μl du réactif de Griess (0.5% N-1-naphtyl éthylène diamine dans HCl 20%, 5% sulfanilamide dans HCl 20% (1 V/V). Après 20 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à 543 nm. La concentration des nitrites est déterminée par extrapolation des absorbances sur une courbe d'étalonnage effectuée dans les mêmes conditions expérimentales.

II.3.4. Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Le dosage des protéines des liquides hydatiques est effectué par la méthode de Bradford par addition de 100 μl d'échantillon à 3 ml du réactif de Bradford, la densité optique est mesurée par spectrophotométrie à 595nm (Bradford, 1976). La concentration des protéines est déterminée par extrapolation de la densité optique sur une courbe d'étalonnage élaborée dans les mêmes conditions à partir d'une solution mère de sérum albumine bovine (0,1%).

II.3.5. Extraction des protéines

II.3.5.1. Préparation de l'extrait protéique du liquide hydatique

Les liquides hydatique sont aspirés individuellement dans des conditions aseptiques avec une aiguille très fine et centrifugés à 10,000×g pendant 15 min à +4°C. Le culot contenant des protoscolex est récupéré dans du tampon PBS pH 7,2.

Les protéines présentes dans les liquides hydatiques sont ensuite précipitées avec de l'acétone glacial (1 V/3V). Après précipitation des protéines pendant une nuit à -20°C, les échantillons sont centrifugés à 10,000 × g pendant 15 min à +4°C. Les précipités sont lavés trois fois avec de l'acétone glacial. L'acétone résiduel est éliminé par séchage à l'air libre sous hotte.

Les protéines précipitées sont resuspendues dans un tampon dénommé communément le "Dye Labelling buffer" (DLA) (7M Ureé, 2M Thiourée, 4% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) diméthylammonio]-1-propanosulfonate), 30 mM de Tris). Les échantillons sont mélangés et centrifugés à 13000xg/10min. Les précipités sont solubilisés par sonication douce et ce cinq fois, pour désagréger les protéines agglutinées. Les extraits protéiques sont conservés à -80°C pour une utilisation ultérieure.

II.3.5.2. Extraction des protéines solubles à partir des protoscolex

Les culots de protoscolex sont repris dans du tampon PBS à pH 7,2 stérile puis on procède à cinq lavages afin d'éliminer les protéines contaminantes. Ensuite, les culots contenant les protoscolex sont resuspendus dans le tampon "DLA" à des volumes variables (100µl à 500µl). Les échantillons subiront un choc thermique par des cycles de congélation et décongélation dans de l'azote liquide séparés par des étapes de sonication pendant trois minutes. Les échantillons sont toujours remis dans un bac à glace afin de conserver les protéines et d'inhiber l'activité des protéases. Les extraits protéiques sont conservés à -80 °C.

II.3.5.3. Extraction des protéines solubles à partir de la couche laminaire

Les pièces de membranes laminaires sont lavées plusieurs fois au tampon PBS stérile pH 7,2 (cinq fois). Des volumes variables du tampon DLA sont ajoutés selon la taille des fragments de la couche laminaire. Les échantillons subiront des cycles de congélation dans de l'azote liquide et de décongélation séparée par des étapes de sonication pendant trois minutes. Les échantillons sont toujours remis dans un bac à glace afin de conserver les protéines. Les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

II.3.6. Analyse protéomique et identification des protéines exprimées au niveau de la larve hydatique

Au cours de notre analyse protéomique, la stratégie suivie est basée sur la chromatographie liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Les échantillons sont analysés au niveau peptidique, nécessitant une digestion préalable de l'extrait protéique. Les peptides obtenus sont ensuite séparés par chromatographie liquide

avant d'être analysés par spectrométrie de masse en tandem. Les informations des séquences ainsi obtenues sont ensuite utilisées pour identifier les peptides et les protéines présentes dans l'échantillon.

II.3.6.1. Dosage des protéines par la méthode de Pierce 660

Le dosage des protéines des échantillons destinés à l'analyse protéomique a été réalisé au niveau de la plateforme de protéomique du laboratoire de microbiologie, institut de biologie et de médecine moléculaire, selon la méthode de Pierce 660nm (kit PIERCE 660) de Thermo Fisher scientific®. Un volume de 10µl d'échantillon est additionné à 10 µl du réactif de Pierce 660. On laisse agir pendant 5 minutes. La concentration des protéines est déterminée par extrapolation de la valeur de la densité optique (DO) sur la base d'une courbe étalon établie dans les mêmes conditions expérimentales. Des standards de concentrations croissantes (125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 µg/ml de sérum albumine sont utilisés.

II.3.6.2. Les méthodes de séparation des protéines

II.3.6.2.1. L'électrophorèse bidimensionnelle (2DE)

Cette méthode permet, à l'issue de deux migrations électrophorétiques successives, de visualiser un grand nombre de protéines de façon simultanée. Au cours de notre étude, cette méthode est utilisée pour séparer les protéines d'un liquide hydatique pulmonaire et pour établir des cartes protéiques du protoscolex.

Le principe de cette technique repose sur la séparation des protéines selon deux critères: leur point isoélectrique et leur poids moléculaire (**Figure 16**). Dans la première dimension, on utilise la méthode d'isoélectrofocalisation. Les protéines migrent selon leur point isoélectrique (pI) suivant un gradient de pH préétabli. La seconde dimension est réalisée sur gel SDS-PAGE permettant de réaliser la séparation des protéines selon leurs poids moléculaires (**O'Farrell et al., 1975**).

a. L'isoélectrofocalisation (IEF) par le système Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System

L'isoélectrofocalisation a été effectuée par le système Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System (General Electric-Healthcare). Ce système est optimisé pour assurer la reproductibilité et la haute capacité de chargement des protéines. Il protège également les protéines de la lumière pendant leur migration. Il est adapté aux protéines marquées aux fluorophores (Cy) et d'autres colorants sensibles à la lumière. L'isoélectrofocalisation est réalisée dans un gel de polyacrylamide sous forme de "STRIP" (bandelette) où des

ampholytes sont greffés. Dans nos expériences, nous avons utilisé des strips de 10 cm avec un gradient de pH 4-7 et de 18 cm avec un gradient de pH 3-11.

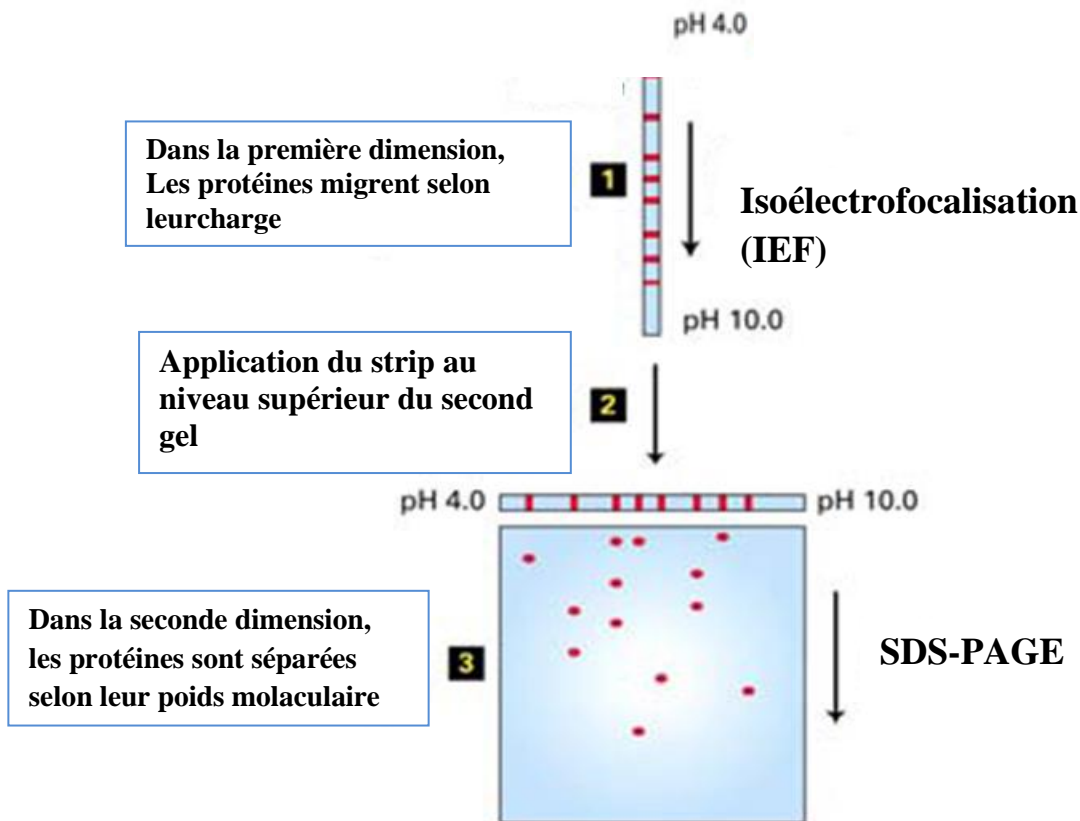


Figure 16: Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE).

a.1. Réhydratation des strips

Les "strips" sont réhydratés une nuit avant d'entreprendre l'isoelectrofocalisation. Un volume de 350 μ l du tampon de réhydratation est utilisé en présence de 1,4 mg de dithiothreitol (DTT) et 2,5 μ l d'ampholytes/0,5ml de tampon. Après 10 min le strip est recouvert avec le cover fluid (de GE ® General Electric-healthcare) afin d'assurer une bonne réhydratation et empêcher l'évaporation du tampon. On laisse réhydrater pendant la nuit à température ambiante et à l'obscurité.

a.2. Préparation de l'échantillon

- i. Contrôle du pH de l'échantillon:** Le pH de l'échantillon est contrôlé par addition de 50 μ l de l'échantillon sur un papier pH Sigma, le pH doit être basique environ 8,5.
- ii. Marquage des protéines**

Le marquage des protéines s'effectue à l'aide des fluorophores de type cyanines. Les fluorophores utilisés sont le Cy3 (rose) et le Cy5 (bleu). L'échantillon protéique d'une

quantité de 25µg de protéines est mélangé à 1µl du fluorophore (Cy3ou Cy5) puis incubé pendant 30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière. Un volume de 1µl de lysine est ajouté pour stopper la réaction. Ajouter le même volume de tampon de l'IEF (IEF Buffer) additionné à 14 mg de DTT et 2,5 µl d'ampholytes / 0,5ml de tampon.

a.3. Dépôts de l'échantillon "Manifold-cup loading"

L'échantillon de l'extrait protéique préalablement marqué au fluorophore est déposé dans une cupule du coté cathodique puis l'échantillon est recouvert avec le "cover fluid". Les échantillons protéiques sont déposés sur le gel grâce à des cupules de dépôt (cup loading). Ce dernier est déposé dans un puit au niveau du "manifold". La concentration des échantillons ne doit pas excéder 5 à 10 mg / ml pour limiter les risques de précipitation des protéines. Dans ce but, le voltage doit être appliqué de façon progressive.

b. Application du SDS-PAGE

À la fin de la première migration des protéines, nous procédons à une étape d'équilibration pour la deuxième migration.

b.1. Etape d'équilibration

Avant de soumettre le strip à une seconde migration, les protéines doivent subir:

- i. Une réduction:** on plonge le strip dans 20 µl du tampon d'équilibration (equilibration buffer: urée, tris, glycérol, SDS, bleu de Bromophénol) en présence du dithreitol (DTT) 2% puis agiter pendant 10min.
- ii. Une alkylation des protéines:** une fois que les protéines sont réduites, le strip est plongé dans 10ml d'une solution contenant de l'iodoacétamide (IAA) (2,5%) puis agiter pendant 10 minutes. Toutes ces étapes se font à l'obscurité. Cette alkylation permet d'empêcher la reformation des ponts disulfures en bloquant les cystéines portant les groupements SH par les molécules d'iodoacétamide.

b.2. La séparation des protéines par SDS-PAGE

Les protéines sont soumises à une deuxième migration en fonction de leurs poids moléculaires pendant deux heures et demie. Le strip est déposé le long d'un gel SDS-PAGE. Un champ électrique est appliqué.

Dans le cas des liquides hydatiques une seule dimension s'est imposée dans le but de séparer les protéines. Le SDS-PAGE est appliqué en raison de l'abondance des protéines sériques. Le SDS-PAGE est appliqué selon la méthode de **Laemli (1970)**.

Brièvement, un gel de 20cm est utilisé afin d'obtenir une meilleure séparation. Les échantillons sont mélangés avec du Laemli et mis à ébullition pendant 5minutes. Les protéines sont séparées sur un gel SDS 12% à 120 V pendant 120 minutes. Les bandes protéiques sont révélées par le bleu de Coomassie.

c. Visualisation des gels

Les gels sont récupérés et visualisés par un scanner à deux lasers au niveau des bandes ou des spots protéiques (Scan typhoon®) qui détecte la fluorescence avec les fluorophores Cy5 (λ d'excitation 550 nm; λ d'émission 570 nm) et Cy3(λ d'excitation 650 nm; λ d'émission 670 nm). Ainsi, il permet de détecter les spots correspondant aux protéines marquées préalablement avec les fluorophores.

Le résultat de d'électrophorèse bidimensionnelle sera l'image acquise au moyen du système d'imagerie de la technologie du Typhoon®. L'image des gels avec des niveaux de gris est observée. Ce scanner fournit également l'image du gel SDS-PAGE.

II.3.6.2.2. La digestion enzymatique des protéines au niveau du gel

L'enzyme la plus généralement utilisée en protéomique est la trypsine (Promega, Leiden, Hollande) comme il a été décrit par **Shevchenko et al. (1996)**. Elle permet d'obtenir des fragments de tailles comprises entre 600 et 5000 Da compatibles avec une analyse en LC-MS/MS. La trypsine clive les protéines à l'extrémité carboxy-terminale des acides aminés, lysine et arginine sauf s'ils sont suivis d'une proline.

Les extraits protéiques des liquides hydatiques sont soumis à un SDS-PAGE. Les bandes apparentes sont coupées manuellement en petites pièces et soumises à une digestion à la trypsine. L'analyse de la composition protéique globale des échantillons nécessite la digestion à la trypsine des protéines présentes dans les pièces de gel découpées. Le prélèvement des "spots" se fait dans une chambre décontaminée (keratin free) où des conditions nécessitant l'absence de toute contamination avec d'autres protéines sont indispensables telle que la kératine.

II.3.6.2.3. Extraction des fragments peptidiques à partir du gel

Les spots ou les bandes de gels sont récupérés grâce à un emporte-pièce puis fragmentés manuellement et récupérés dans des microtubes. Des volumes de 20 à 50 μ l d'acétonitryl (40%) sont ajoutés puis les microtubes sont soumis à une agitation pendant 15 minutes à 37°C. Cette étape est effectuée plusieurs fois jusqu'à décoloration des pièces de gels. Les pièces de gel sont desséchées par addition de l'acétonitryl (100%). Après agitation pendant 15

minutes à température ambiante, le solvant est remplacé par 20 à 50 µl de DTT (10 mM) dissout dans du bicarbonate d'ammonium (NH₄HCO₃) (25 mM). Après incubation pendant 45 minutes à 56°C, le DTT est remplacé par 20 à 50µl d'iodoacetamide (IAA) (55 mM) dans du bicarbonate d'ammonium (25 mM).Après incubation pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'IAA est remplacé par 20 à 50µl d'acétonitril (100%). Les pièces de gel sont séchées pendant 15 minutes. L'acétonitril est récupéré et les tubes sont soumis à une évaporation de l'acétonitril résiduel. Les pièces de gel sont réhydratées avec 3µl de trypsine modifiée (Promega, Leiden, Hollande) (**Shevchenko et al., 1996**).

Des volumes de 10 à 20µl de bicarbonate d'ammonium (25 mM) sont ajoutés puis les pièces sont incubées à 37°C pendant une nuit (minimum 6 heures). Après digestion des protéines, la réaction est stoppée par adition de 1,3µl d'acide formique (0,1%). Les surnageants sont récupérés dans les tubes destinés à l'analyse LC-MS/MS.

II.3.6.2.4. Analyse LC-MS/MS

Les peptides tryptiques obtenus ont été fractionnés sur une nano-HPLC EASY-nLCII (Thermo Fisher Scientific, Odense, Danemark) couplé à un QTOF Ultima mondial (Waters , Zellik, Belgique). Les peptides ont été chargés sur une colonne longue de 10 cm à 75 µm de diamètre interne, garnie avec des particules de C18 de 3 µm de diamètre.

La chromatographie inverse est réalisée avec un système binaire d'un tampon constitué de 0,1 % d'acide formique (tampon A) et 95 % d'acétonitrile dans 0,1 % d'acide formique (tampon B) avec un débit de 300 nl/ min. Le QTOF fonctionne dans le mode dépendant des données et les trois peptides les plus abondants avec 2 et 3 charges sont sélectionnés. Les fichiers bruts ont été traités en utilisant le système "Mascot Daemon" de la plateforme protéomique (institut de biologie et de médecine moléculaire de Gosselies, université libre de Bruxelles, Belgique) selon la méthode du Danemark (**Figure 17**). Les spectres de fragmentation sont recherchés sur la base de données NCBI nrAll (téléchargé le 01 janvier 2009) avec les ions parents et les fragments de tolérance de masse fixées à 100 ppm et 0,8 Da, respectivement. Les paramètres de recherche sur la base de données sont les suivants: la trypsine comme enzyme de digestion avec un 1 site de clivage manqué "miscleavage tryptique" permis, la carbamidomethylation de la cystéine a été définie comme une modification fixe et l'oxydation de la méthionine et l'acide pyroglutamique comme modifications variables. Les estimations de l'algorithme de recherche "MASCOT®" internes s'effectuent avec un intervalle de confiance de 95%. L'identification de protéines a été inspectée manuellement.

Figure 17: Fenêtre des différents paramètres du logiciel MASCOT® (www.matrixscience.com).

II.3.6.2.5. Analyse bioinformatique

Les protéines de l'hôte d'origine humaine ont été classées selon leur fonction moléculaire et le processus biologique dans lequel elles sont impliquées en utilisant le logiciel PANTHER® (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships) par insertion du code gi des protéines identifiées (**Figure 18**).

Les protéines parasitaires ont été annotées par le logiciel gene ontology® (www.geneontology.org) selon leurs fonctions moléculaires et le processus biologique dans lequel elles sont impliquées.

The screenshot displays the PANTHER Classification System web interface. The main navigation bar includes 'Home', 'About', 'PANTHER Data', 'PANTHER Tools', 'Workspace', 'Downloads', and 'Help/Tutorial'. A secondary navigation bar offers 'Gene List Analysis', 'Browse', 'Sequence Search', 'cSNP Scoring', and 'Keyword Search'. On the left, there is a search bar, 'Quick links' (Whole genome function views, Genome statistics, How to cite PANTHER), 'News' (PANTHER tools supporting all 82 organisms), and a 'Newsletter subscription' form.

The central 'Gene List Analysis' section is divided into three steps:

- 1. Enter ids and or select file for batch upload. Else select file or list from workspace for comparing to a reference list.**
 - Enter IDs:** A text input field with a blue arrow pointing to it. Below it, a link for 'Supported IDs' is shown.
 - Upload IDs:** A text input field with a green arrow pointing to it. Below it, a link for 'File format' is shown.
 - Select List Type:** Radio buttons for 'ID List' (selected), 'Previously exported text search results', 'Workspace list', and 'PANTHER Generic Mapping File'.
 - A 'Browse...' button is located to the right of the 'Upload IDs' field, with a red arrow pointing to it and the text 'separate IDs by a space or comma'.
 - A note states: 'Please login to be able to select lists from your workspace.'
- 2. Select organism.**
 - A dropdown menu showing a list of organisms: Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus, Gallus gallus, and Danio rerio.
- 3. Select Analysis.**
 - Radio buttons for 'Functional classification viewed in gene list' (selected), 'Functional classification viewed in pie chart', 'Statistical overrepresentation test', and 'Statistical enrichment test'.

A yellow 'submit' button is located at the bottom right of the form.

Figure 18: Fenêtre du système de classification des protéines PANTHER® (<http://pantherdb.org/>).

II.3.7. Identification des épitopes sur la base de données de l'immunome d'*E. granulosus*

L'identification des antigènes potentiels ainsi que leurs épitopes ont été identifiés par comparaison avec la base de données "immune data basis" de la souche ovine d'*E. granulosus* (Immune Epitope Database and Analysis Resource) (**Figure 19**).

The screenshot shows a web browser window with the URL www.iedb.org/sourceOrgId/6210. The page title is "Echinococcus granulosus: X". The website header includes the IEDB logo and navigation links: Home, Specialized Searches, Analysis Resource, and Help.

Source Organism	
Source Organism	Echinococcus granulosus
Source NCBI Taxonomy ID	6210 ↗
Parent NCBI Taxonomy ID	6209 ↗

Related Information	
Epitopes	47 (Click for related results)
References	11 (Click for related results)
Bcell Assays	193 (Click for related results)
Tcell Assays	0
MHC Ligand Assays	0

Figure 19: Les informations relatives à la base de données des épitopes d'*E. granulosus* (www.iedb.org/sourceORGLD/6210).

II.3.8. L'électrophorèse bidimensionnelle différentielle (DIGE: Différentiel gel electrophoresis)

Il s'agit du multiplexage des populations protéiques au sein d'un même gel. La technique de l'électrophorèse bidimensionnelle différentielle consiste à employer différents esters de succinimidyle de colorants cyanines afin de marquer en fluorescence plusieurs populations protéiques différentes avant de mélanger ces populations et de les faire migrer au sein du même gel. Les gels SERVA® sont utilisés pour la réalisation de la DIGE et le système Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System (GE Healthcare) pour la réalisation de l'isoélectrofocalisation.

-Le système «High Performance Electrophoresis-FlatTop Tower» (HPE™-FlatTop Tower®)

Pour la DIGE, la deuxième migration est effectuée grâce au système HPE™-FlatTop Tower). Le système d'électrophorèse "multi niveaux" est conçu pour un maximum de résolution de quatre séparations. L'unité se compose de quatre chambres horizontales

d'électrophorèse qui sont conçues comme des tiroirs dans un boîtier métallique. Le système fonctionne avec une alimentation externe et un circulateur thermostatique (refroidisseur). Ce système est optimisé pour assurer un transfert complet des protéines à partir de la première à la seconde dimension du gel. Il protège les gels de la lumière pendant la migration.

Les gels utilisés permettent d'utiliser des tensions élevées dans l'électrophorèse combinées avec des gels très fins (0,65 mm), ce qui entraîne des taches et des bandes électrophorétiques hautement concentrées dans leurs positions.

Les gels sont appliqués directement sur une plaque de refroidissement en céramique. Un liquide de refroidissement est préalablement appliqué afin de faciliter le contact entre le gel et la plaque de céramique. Ainsi, la chaleur est transférée des gels lors de l'électrophorèse, le strip est équilibré dans une première solution de DTT puis dans une seconde solution d'IAA selon un protocole bien établi. La solution d'équilibration est fournie avec le système.

Afin de permettre la deuxième migration, le strip est mis dans une fente pour les strips en contact avec le tampon de migration du côté anode. Ce système a été appliqué pour la réalisation de la DIGE pour la comparaison entre les profils d'expression des protéines de protoscolex.

II.3.9. La coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent a été utilisée afin de mettre en évidence des spots protéiques correspondant à des protéines dont la coloration au bleu de Coomassie n'a pas permis de les visualiser. Cette coloration a été appliquée pour l'extrait protéique de protoscolex. Le gel est mis dans une solution de fixation composée de méthanol et d'acide acétique pendant 20 minutes, puis il est incubé dans une autre solution de sensibilisation du Kit NuPage® Novex pendant 30 minutes. Puis le gel est lavé deux fois avec de l'eau milliQ. Le gel est ensuite remis dans une solution de coloration pendant 15 minutes. Après deux lavages avec de l'eau milliQ, le gel est incubé dans une solution de développement pendant 5 minutes. Une solution pour stopper la coloration est additionnée dès que l'intensité de la coloration est atteinte. Enfin, le gel est lavé trois fois avec de l'eau milliQ.

II.3.10. Le «Western blot»

Le western blot a été appliqué pour l'extrait protéique des couches laminaires. Une électrophorèse (SDS-PAGE) a été réalisée. Après migration, le gel récupéré est transféré sur une membrane de nitrocellulose. Après saturation, la membrane est incubée avec une solution d'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C. Puis, la membrane est lavée et incubée dans une

solution d'anticorps secondaire. La révélation est effectuée avec la solution de lumilight (Roche®).

II.3.11. Recherche *in silico* d'une NOS putative au niveau d'*E. granulosus*

La recherche d'une NOS putative au niveau d'*E. granulosus* a été effectuée en utilisant le système 'search term' sur la base de donnée Uni Prot κB®. Les produits des gènes ont été vérifiés manuellement sur la base de données d'*E. granulosus*:

([tp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/Egranulosus_v3_2](http://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/Egranulosus_v3_2)).

II.3.12. Mise en évidence de la production *in vitro* du NO par les protoscolex

Les protoscolex sont obtenus à partir de kystes hydatiques fertiles puis sont lavés plusieurs fois avec le tampon phosphate (PBS) pH 7,2. La viabilité est estimée comme il a été décrit ultérieurement. Les échantillons présentant une viabilité de 98% sont retenus. Les protoscolex sont mis en culture en nombre croissant de parasites 200, 400, 600, 800 et enfin 1000 protoscolex dans 3 ml du milieu DMEM, puis sont incubés à 37°C pendant 12 heures dans une atmosphère humide saturée avec 5% de CO₂. Les surnageants de cultures sont récupérés pour le dosage des nitrites.

Afin de mettre en évidence une activité 'NOS like', des cultures de protoscolex ont été incubées en présence de L-arginine (10mM). Par ailleurs, dans le but de déterminer une activité NOS like dépendante du calcium, nous avons ajouté dans une culture de protoscolex (1000PSC/ml) du chlorure de potassium (KCl) (10mM). Ce dernier empêcherait la dépolarisation membranaire et l'entrée du calcium. Les expériences sont effectuées en triplicata.

II.3.13. Étude histologique d'une biopsie de poumon

La préparation des coupes fines a été effectuée en plusieurs étapes. La fixation des pièces tissulaires est effectuée dans le formaldéhyde 4%. Les pièces fixées sont ensuite déshydratées dans une série de bains d'éthanol de plus en plus concentrés. Un dernier bain est réalisé dans un mélange Ethanol 100°/toluène, puis dans du toluène pur. Les échantillons sont ensuite inclus dans de la paraffine liquide à 60 °C pendant 24 heures. Les blocs de paraffine sont préparés. Les coupes sont réalisées au microtome et montées sur les lames. Les échantillons sont réhydratés et colorés à l'hématoxyline et à l'éosine puis séchés à l'air libre.

II.3.14. Synthèse du peroxy-nitrite par la méthode du «quench flow»

Cette méthode nécessite une solution d'eau oxygénée (0.6M) dans HCl 0.7M et une deuxième solution de nitrite de sodium (0.6M). Ces solutions sont pompées et mélangées au niveau d'une jonction (T). La réaction de l'acide nitreux avec le peroxyde d'hydrogène conduit à la formation de l'acide peroxy-nitreux. Une solution aqueuse de soude NaOH (1.5M) est additionnée rapidement (**Figure 20**).

La solution du peroxy-nitrite synthétisée est récupérée dans une fiole sur un mélange de glace et de sel pour conserver la solution qui est plus stable à des températures inférieures à 0°C. La concentration de la solution du peroxy-nitrite est déterminée par dosage en spectrophotométrie U.V ($\lambda_{max} = 320 \text{ nm}$, le coefficient d'extinction molaire $\epsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

La synthèse du peroxy-nitrite est réalisée avec des rendements compris entre 43 et 57%. Le peroxyde d'hydrogène résiduel est éliminé par addition du dioxyde de manganèse MnO_2 .

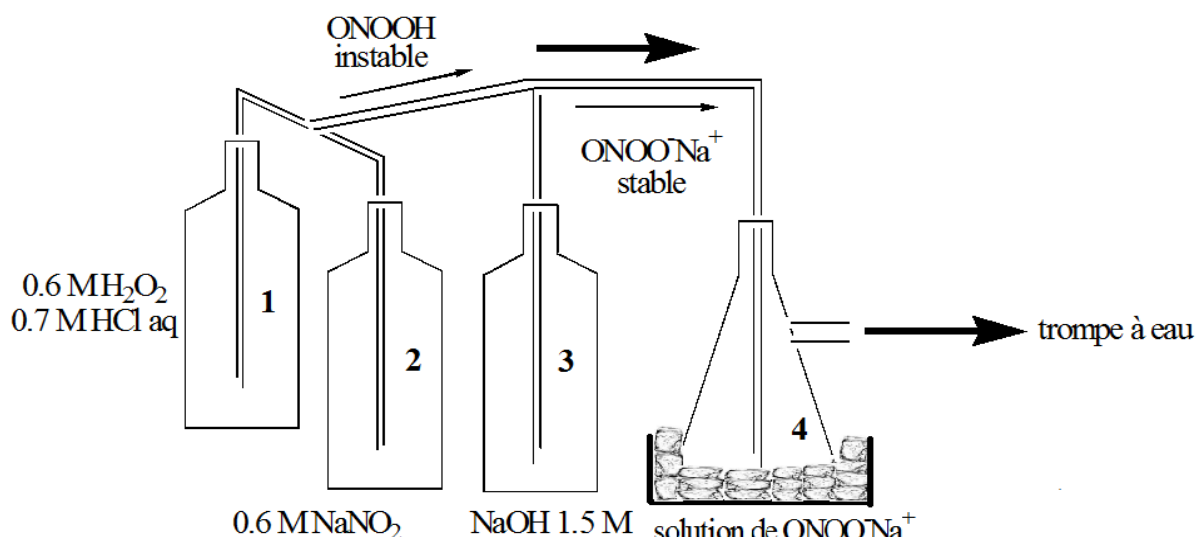


Figure 20: Protocole de synthèse du peroxy-nitrite par la méthode du « quench flow »

Afin d'éviter les interférences avec les nitrites, une DO corrigée est déterminée en mesurant l'absorbance de la solution préparée qui est DO_{SOL} et la $\text{DO}_{\text{sol} + \text{KH}_2\text{PO}_4}$ qui correspond à la densité optique de la solution du peroxy-nitrite après addition de 100mM de phosphate de potassium pH 7,4 (Beckman et al., 1990; Koppenol et al., 1996).

$$\text{Do corrigée} = \text{DO}_{\text{SOL}} - \text{DO}_{\text{sol} + \text{KH}_2\text{PO}_4}$$

La solution du peroxy-nitrite est filtrée et stockée à -70°C .

II.3.15. Étude de l'effet *in vitro* des métabolites de NO (nitrites, nitrates et peroxy-nitrite)

L'action des dérivés du NO a été testée sur les potoscolex et les membranes kystiques (germinative et laminaire). Les potoscolex et les pièces de membranes ont été mis en culture dans le milieu DMEM enrichi avec 10% de SVF en absence et en présence de concentrations croissantes des différents métabolites testés (20, 40, 80, 100, 320 μ M). Les cultures sont incubées dans une atmosphère humide saturée avec 5% de CO₂ pendant 24 heures, 48 heures et 72 heures. Les expériences sont effectuées en triplicata. Les changements morphologiques sont observés au moyen d'un microscope en phase inversée.

II.4. Analyse statistique

L'étude statistique et les représentations graphiques ont été effectuées par le logiciel Origin ProLab® V8.1. La différence entre les moyennes est calculée par le test de student.

L'ANOVA a été utilisé pour l'analyse des taux de viabilité des potoscolex mis en culture en présence des différentes concentrations des métabolites de NO testés. Les valeurs pour $P < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

Le diagramme de Venn a été effectué sur Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.vqstrugent.be/webtools/Venn/>).

RÉSULTATS

III. Résultats

III.1. Étude de la production systémique du NO

L'étude de la production du NO *in vivo* chez les patients atteints d'hydatidose a permis de révéler une augmentation des taux de nitrites chez les patients avant chirurgie ($77,37 \pm 7,24$) μM comparés à ceux des sujets sains ($30,01 \pm 1,96$) μM .

Selon le statut clinique des patients, nos résultats ont montré que les taux de nitrites sont significativement plus élevés chez les patients avant chirurgie en comparaison avec ceux des patients après chirurgie ($49,70 \pm 6,89$) μM ; $P=0,01023$. Nous avons observé avec intérêt une différence dans les teneurs en NO mesurées dans les sérums selon le stade clinique. De manière intéressante, les patients en phase de récurrence ($20,17 \pm 1,62$) μM ont montré des taux inférieurs comparés à ceux des sujets sains. Néanmoins, il n'existe pas de différence significative entre les deux groupes ($P=0,0008$).

Compte tenu des différentes localisations kystiques observées chez les patients, nous avons entrepris une comparaison entre deux localisations kystiques hépatique et pulmonaire. Il en ressort, à travers cette analyse comparative, que le taux de nitrites détecté chez les patients présentant une hydatidose hépatique ($85,12 \pm 5,31$) μM est plus élevé que celui détecté chez les patients présentant une hydatidose pulmonaire ($59,90 \pm 4,14$) μM ; $P=0,029$.

De plus, l'étude comparative de la production systémique des ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) montre des taux significativement élevés dans les sérums de patients portant des kystes hydatiques intacts selon les différentes localisations anatomiques et ce, par rapport aux taux détectés dans les sérums de patients portant des kystes calcifiés. Signalons par ailleurs, que les valeurs des nitrites ne présentent pas de différence significative avec celles des individus sains ($28,64 \pm 2,55$) μM versus ($30,01 \pm 1,96$) μM ; $P=0,7111$. La production des ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) dans les sérums de patients avec des kystes rompus est significativement élevée ($105,81 \pm 14,74$) μM comparée à celle mesurée dans les sérums de patients présentant des kystes calcifiés. La différence entre les deux groupes est statistiquement significative ($P=0,00007$) (**Figure 21**).

III.2. Production de NO dans les liquides hydatiques

Compte tenu de la présence de taux élevés de NO dans les sérums de patients hydatiques, il nous a semblé intéressant de rechercher la production de cette biomolécule dans les liquides hydatiques et d'évaluer l'impact de sa production *in vivo* sur la larve hydatique.

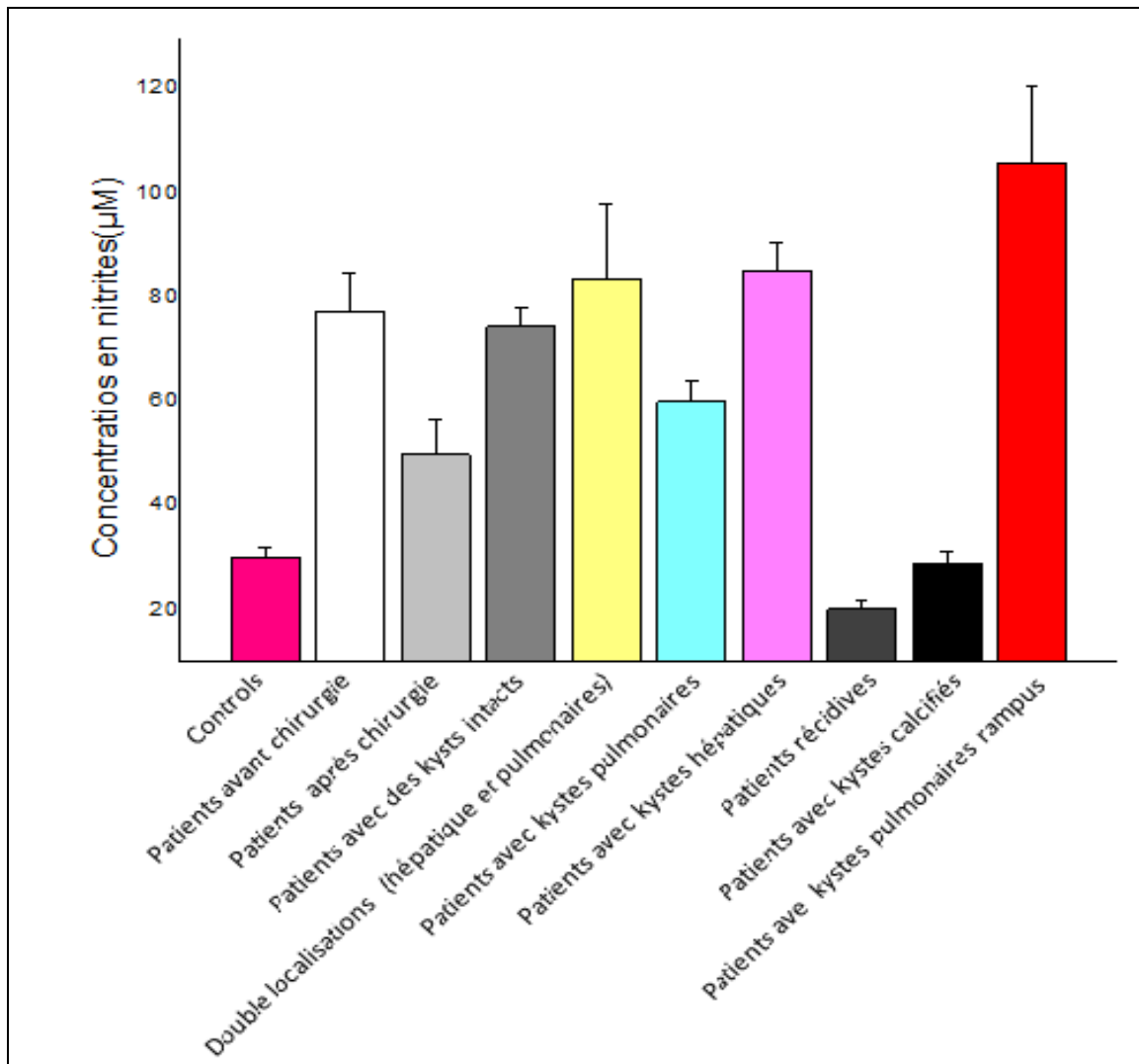


Figure 21: Variation des teneurs en nitrites détectés dans les sérums de patients hydatiques. Les résultats sont exprimés sur la base de la moyenne ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) \pm standard errors (moyenne \pm SD). Patients avant chirurgie ($77,37 \pm 7,24 \mu\text{M}$) vs individus sains ($30,01 \pm 1,96 \mu\text{M}$). Patients avant chirurgie ($77,37 \pm 7,24 \mu\text{M}$) vs patients après chirurgie ($49,70 \pm 6,89 \mu\text{M}$); $P=0,01023$). Patients en phase de récurrence ($20,17 \pm 1,62 \mu\text{M}$) vs individus sains ($P=0,0008$). Patients porteurs de kystes hépatiques ($85,12 \pm 5,31 \mu\text{M}$) vs patients porteurs de kystes pulmonaires ($59,90 \pm 4,14 \mu\text{M}$; $P=0,029$). Patients porteurs de kystes calcifiés vs les individus sains ($28,64 \pm 2,55$ vs $30,01 \pm 1,96$; $P=0,7111$). Patients porteurs de kystes rompus ($105,81 \pm 14,74 \mu\text{M}$) vs patients porteurs de kystes calcifiés. ($P=0,00007$).

Dans ce sens, sa production a été évaluée dans les liquides hydatiques fertiles et non fertiles. Ainsi, nous avons observé avec intérêt que la production des nitrites ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) dans les liquides hydatiques fertiles est plus importante comparée à celle des liquides hydatiques non fertiles.

Nous avons observé des taux élevés des nitrites dans les liquides hydatiques hépatiques fertiles ($29,76 \pm 7,52 \mu\text{M}$) comparés à ceux des liquides hydatiques infertiles ($4,92 \pm 0,43 \mu\text{M}$; $P=0,00004$) (**Figure 22**). Cette élévation a été également observée dans le cas des liquides hydatiques pulmonaires fertiles ($26,55 \pm 4,25 \mu\text{M}$) comparés aux liquides hydatiques infertiles ($4,53 \pm 0,62 \mu\text{M}$; $P= 0,00322$).

D'autre part, nous avons noté avec intérêt que le taux de nitrites dans les liquides hydatiques de localisations rares est variable (**Tableau 5**). Nous avons observé que le taux de nitrites dans les liquides infertiles (musculaire et pancréatique) est faible. À l'inverse, la production des ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) dans le liquide hydatique splénique est importante par rapport aux liquides hydatiques hépatique et pulmonaire. Cette augmentation est probablement associée à la riche vascularisation de cet organe. Toutefois, le taux de nitrites semble élevé dans le liquide hydatique vertébral comparé au liquide hydatique paravertébral suggérant l'existence d'une éventuelle relation avec la fertilité du kyste hydatique.

Nos résultats indiquent que le taux des nitrites produits dans les liquides hydatiques dépend du degré de fertilité des liquides hydatiques. La présence du NO dans les liquides hydatiques suggère que ce radical diffuse probablement à travers les membranes kystiques et/ ou la présence d'une source endogène responsable de la production locale du NO.

III.3. Dosage des protéines dans les liquides hydatiques

Les taux de protéines détectés dans les liquides hépatiques fertiles sont significativement élevés ($0,93231 \pm 0,10435 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) par rapport aux taux détectés dans les liquides infertiles ($0,21 \pm 0,026 \mu\text{g}/\mu\text{l}$; $P= 0,0005$) (**Figure 23**). Ce même résultat est observé pour les liquides hydatiques pulmonaires ($0,695 \pm 0,07166 \text{ mg/ml}$ vs les liquides hydatiques pulmonaires infertiles ($0,18167 \pm 0,01078 \text{ mg/ml}$, $P= 0,00001$).

Néanmoins, dans les localisations rares, il apparaît que le taux de protéines dépend de la localisation et de l'intensité de la vascularisation de l'organe hébergeant le kyste hydatique.

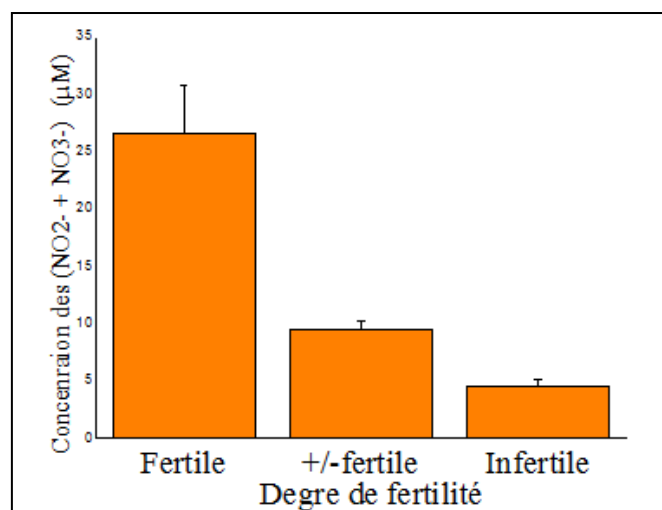


Figure 22: Comparaison des taux de nitrites dans les liquides hydatiques pulmonaires selon leur degré de fertilité. Les résultats sont exprimés sur la base de la moyenne des concentrations des (NO₂⁻ + NO₃⁻) ± standard errors. $P=0,00322$ pour le taux de (NO₂⁻ + NO₃⁻) produits dans les liquides hydatiques fertiles (26,55 ± 4,25 μM; $n=10$) vs les liquides infertiles (4,53 ± 0,62 μM; $n=4$). Les valeurs pour $P < 0.05$ sont considérées statistiquement significatives.

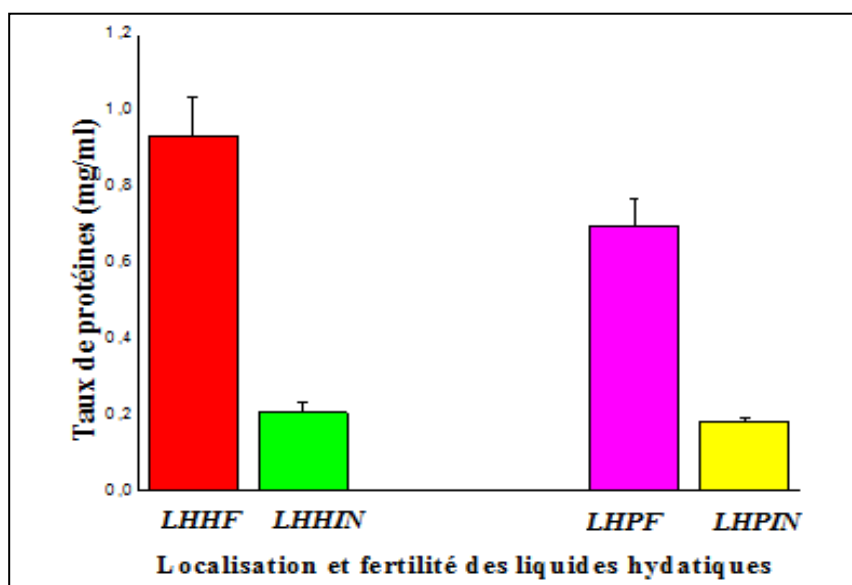


Figure 23: Taux de protéines dans les liquides hydatiques hépatiques et pulmonaires selon leur fertilité. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± SD pour chaque liquide. $P = 0,0005$ pour les taux de protéines détectés dans LHHF (0,93231 ± 0,10435 mg/ml) contre LHHIN (0,21 ± 0,026 mg/ml). LHPF (0,695 ± 0,07166 mg/ml vs LHPIN (0,18167 ± 0,01078 mg/ml, $P = 0,00001$). **LHHF**: liquide hydatique hépatique fertile, **LHHIN**: liquide hydatique hépatique infertile, **LHPF**: liquide hydatique pulmonaire fertile, **LHPIN**: liquide hydatique pulmonaire infertile.

À travers nos résultats, il apparaît que le taux de protéines dans les liquides hydatiques est variable. Il ne dépend pas exclusivement de la fertilité des kystes hydatiques mais il dépendrait également de la localisation et des échanges engagés entre la larve hydatique et l'environnement tissulaire avoisinant la larve sans occulter la vascularisation de l'organe affecté.

Tableau 5: Taux des nitrites ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) et des protéines dans les liquides hydatiques selon la fertilité des kystes hydatiques au cours des localisations rares.

Localisation	Fertilité	<i>n</i>	Concentration des ($\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$) (μM)	Taux de protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
Muscle de la cuisse gauche	-	1	4,10	0,31
Rate	+	1	31,11	1,29
Pancréas	-	1	4,76	1,80
Vertébral	+	1	27,50	1,59
Paravertébral	-	1	2,06	0,22

(-): liquide hydatique infertile; (+): liquide hydatique fertile; *n*: nombre de kystes hydatiques.

III.4. Analyse protéomique relative au stade larvaire d'*E. granulosus*

Compte tenu des teneurs élevées du monoxyde d'azote (NO) retrouvées au niveau des sérums de patients hydatiques et de la présence de faibles teneurs de NO dans les liquides hydatiques qui semblent inefficaces contre la larve hydatique, il nous a semblé intéressant d'explorer le protéome des liquides hydatiques afin d'apporter quelques éclaircissements quant à ce paradoxe et ce, par l'analyse protéomique.

III.4.1. Profil de l'électrophorèse bidimensionnelle (2DE) de l'extrait protéique du liquide hydatique

L'application de l'électrophorèse bidimensionnelle sur l'extrait protéique du liquide hydatique pulmonaire a montré un "streaking" horizontal (**Figure 24**). Des "spots" protéiques ont été coupés et digérés à la trypsine. Les peptides obtenus ont été analysés par LC-MS/MS. L'analyse a permis d'identifier la sérumalbumine et la sérotransferrine qui sont majoritaires. Ces protéines ont entraîné un "streaking" horizontal à l'électrophorèse bidimensionnelle de l'extrait protéique en raison de leur abondance dans le liquide hydatique. Ainsi, la présence de ces protéines empêcherait l'identification des protéines minoritaires



Figure 24: Gel 2-DE représentatif de l'extrait protéique marqué au Cy5 d'un liquide hydatique pulmonaire. 25 μ g de protéines sur un gradient de pH 4-7 (18cm) utilisant l'IEF dans la première dimension et SDS-PAGE dans la seconde dimension. Spot 1, 2, 3, 4 : albumine, Spot 5 et 6 : Transferrine.

présentes dans le liquide hydatique. Ces résultats nous ont orientés vers la réalisation d'une "SDS-PAGE" afin d'obtenir une meilleure séparation des protéines.

III.4.2. Le profil protéique des liquides hydatiques sur SDS-PAGE

Le profil obtenu par "SDS-PAGE" des extraits protéiques des trois liquides hydatiques sélectionnés en vue de l'analyse protéomique (pulmonaire, vertébral, et paravertébral).

Le profil protéique relatif à chaque liquide a montré un complexe de protéines variant d'un poids moléculaire de moins de 10 kDa à 170 kDa avec une bande majeure située entre 40–70 kDa correspondant à l'albumine.

Nous avons noté avec intérêt la présence d'une bande commune aux liquides hydatiques fertiles et absente dans le liquide hydatique non fertile correspondant à un haut poids moléculaire de 170kDa. Cette dernière a été identifiée par spectromètre de masse comme étant la ferritine d'*E. granulosus* suggérant son étroite relation avec la fertilité des kystes hydatiques. Par ailleurs, nous avons observé que le profil protéique du liquide hydatique LHPV indiquait quelques bandes protéiques en comparaison à celui des liquides hydatiques fertiles (**Figure 25**).

III.4.3. Analyse fonctionnelle des protéines putatives exprimées dans les liquides hydatiques selon leur localisation

L'analyse que nous avons menée a été appliquée pour les liquides hydatiques humains selon leur localisation et leur fertilité. Elle a pour objectif principal d'étudier et de rechercher l'impact du monoxyde d'azote sur le protéome du stade larvaire d'*E. granulosus*.

L'analyse protéomique a permis d'établir un inventaire des protéines putatives présentes dans les liquides hydatiques. De plus, l'étude du protéome de trois liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV) a permis de décrire d'une façon dynamique les protéines exprimées par la larve hydatique selon la localisation kystique et la fertilité. Cette analyse a également permis de mettre en évidence une différence dans l'expression des protéines dans les liquides hydatiques qui semble dépendre de la localisation des kystes hydatiques et de leur fertilité confortant nos observations quant au taux de protéines retrouvés dans les liquides hydatiques.

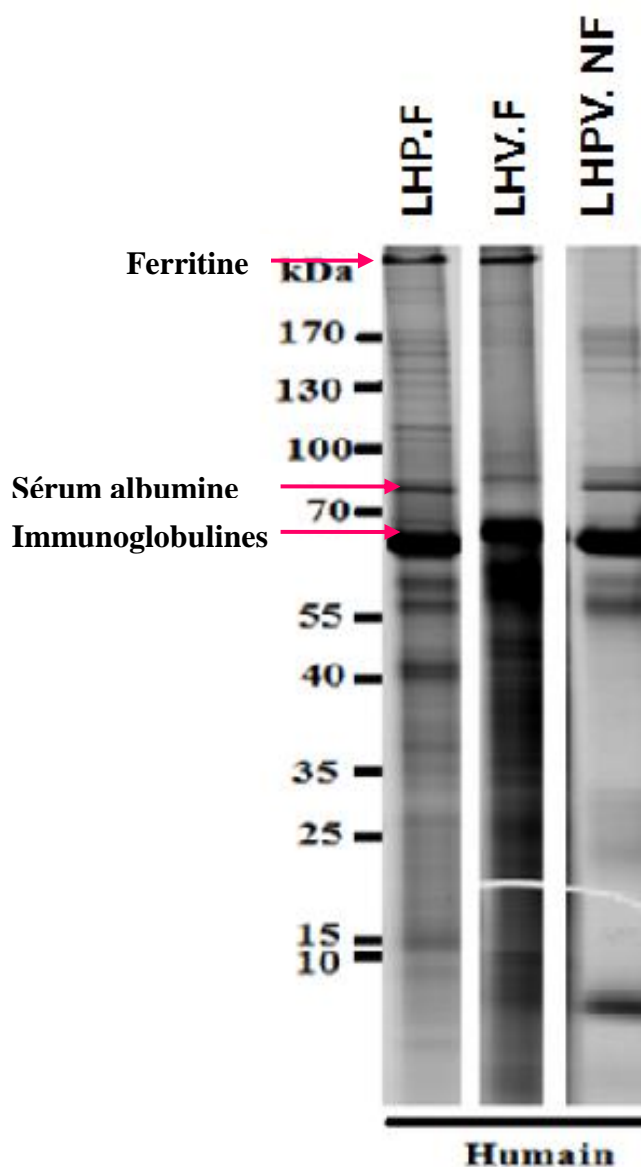


Figure 25: Gel SDS -PAGE des protéines extraites du liquide hydatique humain (20 µg) après coloration avec le bleu de Coomassie. Les bandes apparentes sont coupées et soumises à une digestion à la trypsine avant d'être analysées au LC-MS/MS. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à gauche du gel. **LHV:** Liquide hydatique vertébral; **LHPV:** Liquide hydatique paravertébral, **LHP:** Liquide hydatique pulmonaire (**F:** Fertile, **nf:** non fertile)

III.4.3.1. Identification des protéines putatives au niveau des liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV)

L'identification des protéines a été effectuée par comparaison avec la base de données NCBI Inr All® en utilisant le logiciel MASCOT® (www.matrixscience.com) de la plate forme de protéomique du laboratoire de microbiologie, département de biologie moléculaire, Institut de Médecine et de Biologie Moléculaire (IBMM), Université libres de Bruxelles, Belgique selon les paramètres suivants: (seuil du $p < 0.05$, enzyme: la trypsine, nombre de sites de clivage manqués:1, les modifications fixes: Cysteine carbamidomethyl alkylation, modification variable: oxidation de la Methionine, masse peptidique tolérée: 50 ppm par ion parent, charge des peptides: 2+ et 3+).

III.4.3.2. Analyse bioinformatique

L'analyse bioinformatique menée dans nos conditions est spécifiquement appliquée aux extraits protéiques des liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV). L'identification à la fois des protéines de l'hôte et des protéines parasites a permis de montrer la haute complexité de la relation hôte/parasite et a conduit à l'identification des protéines à différentes fonctions moléculaires analysées et classées selon le système "gene ontology" (<http://www.geneontology.org>) pour les protéines parasites.

Les protéines de l'hôte ont été analysées et classées selon le système de classification PANTHER® (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships Version 9.0, release date Jan 20, 2014).

j. Identification des protéines d'origine humaine de l'hôte.

L'analyse protéomique a permis d'identifier de nouvelles protéines présentes dans le liquide hydatique d'origine humaine (*Homo sapiens*). Certaines protéines sont spécifiques à la localisation kystique. Ainsi, le précurseur de la sérum albumine (gi|6013427), la lactoferrine (gi|186833) (**Tableau 6**), l'alpha-1-antitrypsine (gi|24438, gi|177827), l'antithrombine III (gi|179161) (**Tableau 8**), deux protéines heat shock 70 kDa (gi|194388088, gi|34419635) (**Tableau 9**), l'histone H2A type1 (gi|4504239) (**Tableau 11**), deux immunoglobulines (gi|323432985, gi|323432992) et l'alpha-1-B-glycoprotéine (gi|69990) (**Tableau 12**) sont présentes spécifiquement dans le liquide hydatique pulmonaire (LHP).

Par ailleurs, les protéines suivantes: la chaîne A de la sérum albumine humaine (gi|157830361), la transferrine (gi|110590597), la protéine C9 du complément (gi|179726), les immunoglobulines (gi|10334541, gi|8918518, gi|62871078, gi|1913916), la chitinase

(gi|23512215) et certaines enzymes métaboliques, tels que la fructose-1,6-biphosphatase (gi|182311), l'énolase (gi|31179), et la glycogène phosphorylase (gi|183353) sont exclusivement présentes dans le liquide hydatique vertébral (LHV) (**Tableau 7**).

D'autre part, l'identification de quelques protéines dans le liquide hydatique paravertébral infertile a montré que la majeure partie de ses protéines sont des immunoglobulines (gi|12054074, gi|184759, gi|1827928, gi|468243, gi|170684576, gi|21669343, gi|9968499) (**Tableau 12**). Ces protéines sont exclusivement présentes dans ce liquide hydatique.

Tableau 6: Protéines d'origine humaine impliquées dans le transport.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Transport						
Sérum albumine	gi 28592	294	165	267	6-5-6	3-2-6
Albumine	gi 119626083	-	-	165	5	1
Chaîne A, sérum albumine humaine	gi 157830361	818	184	332	17-7-9	9-5-6
Précurseur de la sérum albumine	gi 6013427	1187	-	-	21	1
Transferrine	gi 553788	-	113	-	3	2
Précurseur de la serotransferrine	gi 4557871	294	1004	506	7-20-13	3-1-8
Chaîne A, Apo sérum transferrine humaine	gi 110590597	-	995	-	19	4
Lactoferrine	gi 186833	104	-	-	3	3
Précurseur de l'hémopexine	gi 386789	96	114	-	3-4	3-4

#: Nombre.

Tableau 7: Protéines d'origine humaine impliquées dans le métabolisme.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT®score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Gluconéogénèse						
Fructose-1,6-bisphosphatase	gi 182311	-	81	-	2	2
Glycolyse						
2-phosphopyruvate-hydratase alpha-énolase carbonate déshydratase	gi 693933	-	69	-	3	2
Enolase	gi 31179	-	58	-	2	1
Processus métabolique du Glycogène						
Glycogène phosphorylase	gi 183353	-	67	-	2	2
Processus métabolique des Polysaccharides						
Chitinase 3-like 1 (glycoprotéine-39 du cartilage)	gi 23512215	-	78	-	3	2

Tableau 8: Identification des inhibiteurs de protéases d'origine humaine.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Inhibiteur de protéases						
Alpha-1-antitrypsine	gi 177827	108	65	-	2-3	3-3
Alpha-1-antitrypsine	gi 24438	130	-	-	2	2
Antithrombine III	gi 179161	130	-	-	3	2

Tableau 9: Protéines humaines impliquées dans le système immunitaire.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® Score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Défense/immunité /protéase						
Protéine C9 du complément	gi 179726	-	95	-	2	2
Précurseur de l'haptoglobine	gi 306882	76	94	-	3-2	3-2
Processus du système immunitaire						
Heat shock 70 kDa protein 1A/1B	gi 194388088	133	-	-	3	1
Heat shock 70 kDa protein 6	gi 34419635	167	-	-	2	2
Réponse inflammatoire						
Alpha-1-acid glycoprotéine 1 (AGP1)	gi 112877	-	81	-	3	1

Tableau 10: Protéines antioxydantes d'origine humaine.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Activité antioxydante						
Peroxi-rédoxine-4	gi 5453549	-	59	-	3	1

Tableau 11: Protéines structurales d'origine humaine

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Constituant structural du cytosquelette						
beta-actine mutante	gi 28336	114	497	-	4-9	1-0
Protéine predate similaire à l'actine alpha 1 du muscle squelettique	gi 169213772	-	61	-	2	2
Organisation de la chromatine /protéine liant l'ADN						
Histone H2A type 1	gi 4504239	86	-	-	1	1

Tableau 12: Protéines identifiées dont la fonction moléculaire est inconnue.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	MASCOT® Score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
		LHP	LHV	LHPV		
Ontology inconnue						
Beta-globine	gi 183817	-	-	146	2	1
Immunoglobuline heavy chain	gi 10334541	-	178	-	5	1
Immunoglobulin gamma heavy chain	gi 8918518	-	142	-	3	1
Immunoglobulin heavy chain constant region gamma 4	gi 12054078	133	120	-	3-3	1-1
Immunoglobulin alpha heavy chain variable region	gi 62871078	-	68	-	2	2
Immunoglobulin heavy chain constant region gamma 2	gi 12054074	-	-	92	4	1
Immunoglobulin gamma-4 heavychain	gi 184759	-	-	75	3	2
Ig gamma-1 chain C region	gi 121039	92	-	90	3-5	1-1
Chain L, Igg Fab (human IgG1, kappa)	gi 1827928	-	-	166	3	1
Immunoglobulin kappa light chain	gi 468243	-	-	144	3	1
Immunoglobulin kappa 4 light chain	gi 170684576	-	-	135	3	1
Immunoglobulin kappa light chain VLJ region	gi 21669343	-	-	121	3	1
Immunoglobulin kappa chain variable region	gi 9968499	-	-	68	3	2
Immunoglobulin variable region	gi 323432985	115	-	-	2	1
Immunoglobulin variable region	gi 323432992	84	-	-	2	1
Anti-HIV-1 gp120 immunoglobulin heavy chain	gi 272982598	315	444	-	8-9	1-1
Alpha-1-B-glycoprotéine	gi 69990	62	-	-	2	2
Immunoglobulin Fd chain	gi 1913916	-	136	-	3	1

De plus, la comparaison des protéomes des trois liquides hydatiques a également montré la présence de protéines sériques communes telles que la sérum albumine (gi|28592, gi|157830361), le précurseur de la sérotransferrine (gi|4557871) et la chaîne A de l'albumine sérique humaine (gi|157830361) (**Figure 26**).

Il apparaît toutefois, que la sérum albumine est abondante dans les kystes hydatiques. Dans le contexte de notre étude portant sur les effets du NO, nous suggérons que cette protéine d'activité antioxydante pourrait jouer un rôle potentiel dans la protection du macroparasite contre les effets délétères exercés par NO.

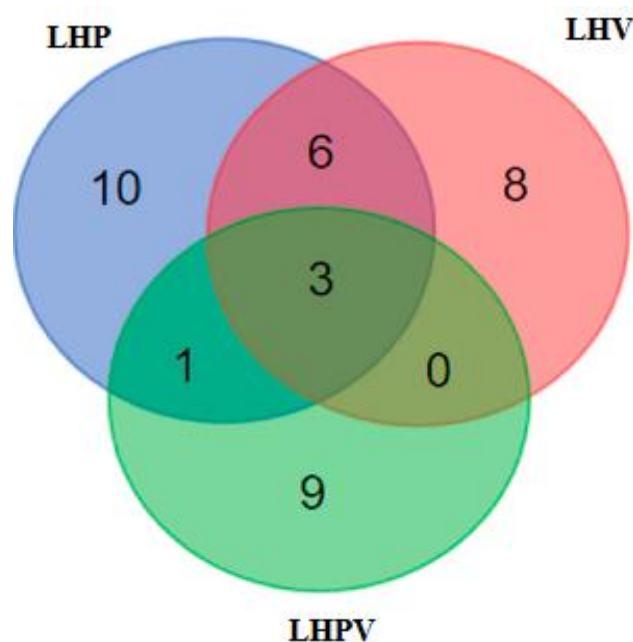


Figure 26: Diagramme de Venn représentant la répartition des protéines de l'hôte identifiées dans les liquides hydatiques (LHP, LHV et LHPV). Les chiffres représentés indiquent le niveau de chevauchement entre les liquides hydatiques.

ii. Identification des protéines parasitaires

L'analyse protéomique a révélé une différence dans le profil d'expression des protéines parasitaires. Elle apparaît dépendre de la localisation kystique et de la fertilité des liquides hydatiques. Il est à noter que les liquides hydatiques fertiles (LHP et LHV) présentent un nombre plus important de protéines comparés au liquide hydatique infertile (LHPV) (**Figure 27**). Cependant, une seule protéine parasitaire a été identifiée dans le liquide hydatique paravertébral correspondant à la citrate synthase (gi|674572145). Cette enzyme a été retrouvée dans le liquide hydatique pulmonaire (LHP) (**Tableau 13**). Différentes protéines parasitaires impliquées dans le métabolisme, des protéines du stress, des protéines structurales et antigéniques ont été détectées dans les liquides hydatiques fertiles (LHP et LHV) (**Tableaux 14, 15**).

L'analyse a montré que la plus part de ces protéines sont des isoformes d'une même protéine, leur présence est validée par le séquençage de leur peptide unique. Cependant, la malate déshydrogénase est présente en une seule isoforme dans le liquide hydatique pulmonaire (LHP) (gi|556520106) et trois isoformes dans le liquide hydatique vertébral (LHV) (gi|46406288, gi|6016537, gi|62178022). D'autres protéines fonctionnellement différentes sont exprimées selon la localisation des kystes hydatiques.

La présence de protéines parasites dans le liquide hydatique pulmonaire suggère leur implication dans les processus suivants :

La glycolyse (Putative glucose phosphate isomérase, Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et l'enolase), la chaîne pentose phosphate (transaldolase), métabolisme du galactose galactose (UDP glucose 4 épimérase), métabolisme des acides aminés (glutamate déshydrogénase et l'ornithine aminotransférase), l'hydrolyse peptidique (la calpaine), DNA translation (threonyl tRNA synthetase C), les protéines chaperones (HSP20, HSP70, protéine disulfide isomérase), membrane binding (annexines) et actin binding (gelsoline, myosine, filamine et l'actinine) (**Tableaux 13, 14, 15**).

Quelques protéines uniques au parasite sont présentes dans le liquide hydatique (LHV) comparé au LHP. Nous pouvons citer: la cyclophiline (liaison peptidique, le facteur d'élongation-1 alpha (EF1 alpha) impliqué dans la biosynthèse des protéines et notamment deux enzymes antioxydantes telque la 2-cys peroxyrédoxine et la thiorédoxine peroxydase (**Tableau 16**).

Nous avons observé avec intérêt une différence dans la composition antigénique des liquides hydatiques De manière intéressante, nous avons noté que l'antigène B est présent dans le LHP, l'antigène S dans le LHV alors que l'antigène 5 et la protéine14-3-3 sont communs aux deux localisations (**Tableau 17**).

Tableau 13: Protéines parasites impliquées dans le métabolisme.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT® score			# de peptides matchés	# of peptides uniques
			LHP	LHV	LHPV		
Chaîne Pentose-phosphate							
Transaldolase	gi 556522327	<i>E. granulosus</i>	100	-	-	2	2
Processus métabolique du galactose							
UDP glucose 4 épimérase	gi 556514599	<i>E. granulosus</i>	68	-	-	2	2
Glycolyse							
Putative glucose phosphate isomérase	gi 62178020	<i>E. granulosus</i>	178	-	-	5	5
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	gi 149364041	<i>Taenia solium</i>	89	137	-	3	1
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	gi 556517778	<i>E. granulosus</i>	89	-	-	2	1
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	gi 6016079	<i>E.multilocularis</i>	-	234	-	6	3
Enolase	gi 262192839	<i>E. granulosus</i>	199	827	-	4-14	2-8
Enolase	gi 261266611	<i>Taenia asiatica</i>	156	564	-	3-6	1-1

Suite tableau 13

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT ® score			# de peptides matchés	# of peptides uniques
			LHP	LHV	LHPV		
Fructose-1,6- bisphosphate aldolase	gi 556514117	<i>E. granulosus</i>	641	-	-	12	11
Fructose-bisphosphate aldolase	gi 29336561	<i>E. multilocularis</i>	-	576	-	11	11
Lactate déshydrogénase A	gi 375112322	<i>E. granulosus</i>	134	-	-	4	4
Cycle tricarboxylique							
Malate déshydrogénase	gi 556520106	<i>E. granulosus</i>	182	-	-	3	3
Malate déshydrogénase	gi 46406288	<i>E. granulosus</i>	-	95	-	2	2
Malate déshydrogénase cytoplasmique	gi 6016537	<i>E. granulosus</i>	-	435	-	8	3
malate déshydrogénase Putative	gi 62178022	<i>E. granulosus</i>	-	215	-	6	1
Citrate synthase	gi 674572145	<i>E. granulosus</i>	479	-	62	10-2	3-2
Gluconéogénèse							
Phosphoénol pyruvate carboxykinase	gi 338827788	<i>E. granulosus</i>	335	-	-	8	5
Phosphoénol pyruvate carboxykinase	gi 338827786	<i>E. multilocularis</i>	122	-	-	2	1
Phosphoénol pyruvate carboxykinase	gi 283466470	<i>E. granulosus</i>	-	511	-	8	8
Phosphoenol pyruvate carboxykinase	gi 283466482	<i>Taenia solium</i>	-	272	-	6	1
Glycogénolyse							
Glycogène phosphorylase	gi 556517139	<i>E. granulosus</i>	160	-	-	3	3
Métabolisme des acides aminés							
Glutamate déshydrogénase 2	gi 576694207	<i>E. granulosus</i>	630	-	-	10	10
Biosynthèse des protéines							
Elongation factor 1 alpha	gi 148717321	<i>E. multilocularis</i>	-	72	-	2	2
Aminotransférase							
Ornithine aminotransférase	gi 576698640	<i>E. granulosus</i>	395	-	-	7	7
Activité transférase							
Glutathione S-transférase	gi 2316076	<i>E. granulosus</i>	85	108	-	3-3	3-3
UTP glucose 1 phosphate uridylyl transférase	gi 576700328	<i>E. granulosus</i>	94	-	-	2	2

Tableau 14: Protéines parasitaires de liaison.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT ® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
			LHP	LHV	LHPV		
Liaison à l'ion ferrique							
Ferritine	gi 110558962	<i>E. granulosus</i>	-	168	-	3	
Ferritine heavy chain	gi 576692417	<i>E. granulosus</i>	62	323	-	2-6	
Liaison peptidique							
Cyclophiline (Peptidyl-prolyl cis-transisomérase)	gi 31077167	<i>E. granulosus</i>	-	68	-	2	2
Liaison à l'ATP							
Thréonyl tRNA synthétase C	gi 556521465	<i>E. granulosus</i>	381	-	-	8	7
Liaison à l'ion calcium							
Annexine A8	gi 576701205	<i>E. granulosus</i>	134	-	-	4	4
Annexine A7	gi 576695517	<i>E. granulosus</i>	102	-	-	2	2
Annexine A6	gi 576697441	<i>E. granulosus</i>	95	-	-	3	3
Annexine	gi 556519264	<i>E. granulosus</i>	272	-	-	6	6
Annexine	gi 556517680	<i>E. granulosus</i>	264	-	-	8	8

Tableau 15: Protéines parasitaires de structure.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT ® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
			PHF	VHF	PVHF		
Glutamate déshydrogénase 2	gi 576694207	<i>E. granulosus</i>	630	-	-	10	10
Composant du cytosquelette							
Actine-1	gi 543766	<i>E. granulosus</i>	-	265	-	8	1
Actine	gi 467215	<i>D. dendriticum</i>	221	-	-	5	1
Spectrine alpha actinine	gi 556521777	<i>E. granulosus</i>	62	-	-	2	2
Actin filament capping/actin binding							
Actin-filament fragmenting protein	gi 12641925	<i>E. granulosus</i>	-	220	-	5	5
Gelsoline	gi 556513882	<i>E. granulosus</i>	69	-	-	3	3
Myosin heavy chain	gi 556522013	<i>E. granulosus</i>	137	-	-	5	3
Filamine	gi 556513666	<i>E. granulosus</i>	95	-	-	2	2
Alpha actinine sarcomérique	gi 576699978	<i>E. granulosus</i>	86	-	-	2	2
Activité motrice							
Paramyosine	gi 556512729	<i>E. granulosus</i>	1030	-	-	20	5
Paramyosine	gi 547974	<i>E. granulosus</i>	-	1222	-	25	25
Myosin heavy chain	gi 556522013	<i>E. granulosus</i>	137	-	-	5	3

Tableau16: Les protéines parasitaires antioxydantes.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT® score			# de peptides matchés	# de peptides uniques
			LHP	LHV	LHPV		
Activité peroxiredoxine							
2-Cys peroxiredoxine	gi 158519654	<i>Taenia solium</i>	-	150	-	3	1
Détoxification cellulaire oxydante /activité antioxydante							
Thioredoxine peroxidase	gi 22775336	<i>E. multilocularis</i>	-	249	-	5	3
Thioredoxine peroxidase	gi 4104346	<i>E. granulosus</i>	-	171	-	3	2
Homéostasie du redox cellulaire							
Putative proteindisulfide-isomerase ER-60	gi 576698733	<i>E. granulosus</i>	189	-	-	3	3
Protein disulfide isomerase	gi 556522176	<i>E. granulosus</i>	71	-	-	3	3

Tableau 17: Protéines parasitaires à caractère antigénique.

Fonction moléculaire / processus biologique	Accession #	Espèces	MASCOT® score			# de peptides matchés	# peptides uniques
			LHP	LHV	LHPV		
Antigènes							
Antigène S epitope	gi 158840	<i>E. granulosus</i>	-	91	-	2	2
Ag5	gi 385682862	<i>E. granulosus</i>	363	-	-	5	5
Précurseur de l'Ag5	gi 27651943	<i>E. granulosus</i>	-	442	-	7	7
S/U 22 kDa de l'antigène 5	gi 296012060	<i>E. granulosus</i>	-	97	-	2	1
S/U 4 de l'antigène B	gi 34550886	<i>E. granulosus</i>	87	-	-	2	2
14-3-3 protéine putative	gi 62178030	<i>E. granulosus</i>	283	181	-	5-5	5-5
14 3-3 protéines epsilon	gi 556517565	<i>E. granulosus</i>	126	-	-	2	2

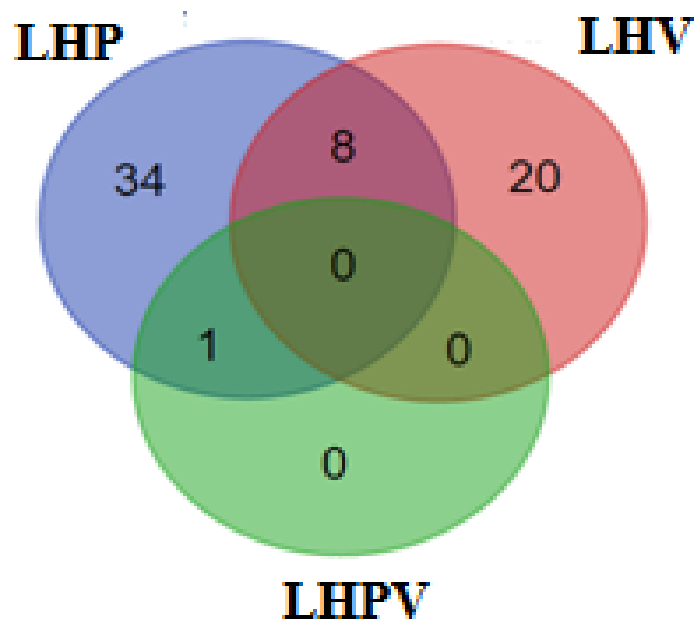


Figure 27: Le diagramme de Venn représentant la répartition des protéines parasitaires identifiées dans les liquides hydatiques (LHP, LHV et LHPV). Les chiffres représentés indiquent le niveau de chevauchement entre les liquides hydatiques.

III.4.3.3. Comparaison de la composition antigénique des liquides hydatiques (LHP, LHV, LHPV)

L'analyse protéomique a montré une variation dans l'expression des protéines antigéniques des liquides hydatiques fertiles, la présence des protéines antigéniques semble être associée à la fertilité des kystes hydatiques. Les produits de sécrétion et d'excrétion des protoscolex augmenteraient le répertoire protéique des liquides hydatiques. La variation antigénique des liquides hydatiques pourrait être associée à une différence dans le niveau de l'immunostimulation, contribuant à une différence dans la production du monoxyde d'azote rapportée *in vivo*.

Tableau 18: Comparaison entre les antigènes les plus importants identifiés dans les liquides hydatiques (LHP), (LHV) et LHPV. +: identifié; - : Non identifié.

Antigènes	PHF	VHF	PVHF
Antigène 5	+	+	-
S/U de 22kDa de l'antigène 5	+	+	-
Antigène B	-	-	-
Antigène B 4	+	-	-
Antigen S epitope	-	+	-
Tropomyosine (Trp)	-	+	-
Paramyosine	+	+	-
Thioredoxine peroxydase (TPx)	-	+	-
Cyclophiline (EA21)	-	+	-
Heat shock protein 70 (HSP70)	+	+	-
Heat shock protein 20 (HSP20)	-	-	-
Major egg antigen p40	+	-	-
Actine	+	+	-
Elongation factor 1 alpha	-	+	-
Enolase	+	+	-
Tegumental protein (EgTeg)	-	+	-

III.4.3.4. Identification des antigènes (épitopes) importants d'*E.granulosus*

À travers l'analyse protéomique entreprise, plusieurs protéines antigéniques ont été identifiées et séquencées. Les séquences ont été rapportées. L'identification des antigènes ainsi que leurs épitopes a été effectuée selon la base de données des épitopes d'*Echinococcus granulosus* (Immune Epitope Database and Analysis Resource): Les épitopes sont représentés en bleu. La comparaison des séquences d'acides aminés des protéines identifiées a permis d'identifier une nouvelle isoforme de la protéine antigénique: la paramyosine (**Figure 28**).

Ag5 precursor

MARSRPLWIVFVCLFATAALGLELTLDPDELVKAQRESHGGFYFYDSNGATLMFNRSLFVYRENIY
 DGWSRWSECSPTHLEHRYRRCVDDSYTQPVNYLTSSARICPFKYIAEERPCEDKSNCIINSKPSEEL
 TRMQEKCGIRGSFDKNTAKPSRRRWKDMDDDEADDAEAEERGEYESERLPYSLKILGGKSAKSKS
 WPWHVGIYKAANYNASEGLTRLKSENIICGGTLITPRWVLTAAHCLKPIFGSSNALPFGIPAPLNTD
 EMKPIFLLRAGDVTLEGTRTRNEQESDHVVAWSSFIRIGLPNVLISPFDVALLRLETPVNIESDGAG
 VACVPKNADATPAEDAVCFVGVGWEKSRPISKPRRRRPTFFNPFWFPGRLWERRPQRPTSLNEIR
 VSIDPPEKRFHHDENEAQICAGSSNKGVCAGDTGGGLFCRNEEDGRWYVYGVMSGPTQYCKS
 RRWLYNSVGSVIQWINRYAV

Putative 14-3-3 protein

MSSLSKREENVYMAKLCEQCERYDEMVKAMKDVLESGADLSVEERNLLSVAYKNVVGARRSSW
 RVISSIEQKHDGDAKMQIAKKVREEIERELSATCKEILDLLDKTLLPAASSESEKIFFLKMKGDYYRY
 VAEFCTGDERKQASDNSLMAYKSATEVAEGDMQTTHPIRLGLALNFSVFYIEIMNPNKRACELAR
 KAFDDAVAELDTLPEESYKDATLIMQLLRDNLTWNSDAGDTDAEPPKAD

22 kDa antigen 5

LELTLDPDELVKAQRESHGGFYFYDSNGATLMFNRSLFVYRENIYDGWSRWSECSPTHLEHRYR
 RCVDDSYTQPVNYLTSSARICPFKYIAEERPCEDKSNCIINSKPSEELTRMQEKCGIRGSFDKNTAKP
 SRRRWKDMDDDEADDAEAEERGEYESERLPY

Thioredoxin peroxidase

APSFTCKALVDGELKDVSLSDYRGKYVILFFYPMDFTFVCPTEIIAFNDRADEFHQRGCQLLACSTD
 SGYCHLAWNNVSRKEGGVQGMRIPLADTNHKISRDYGVLIEDQGIALRGLFIIDDKGVLRQITIN
 DLPVGRSVDEALRLLDAFQFTDKHGEVCPANWQPGSKTFKPSAGDLKSFMS

Glutathione S-transferase

MAPTLAYWDIRGLAEQSRLLLKYLEVEYDDKRYKIGSTPTFDRSAWLSEKFSGLDFPNLPYYIDG
 DFKLTQSGAILEYIADRHGMIPDCKKRAVLHMLQCEVVDLRMAFTRTCYSPDFEKLKPLFETLA
 QKLPNFEAYLGEKEWLTGDKINYPDFSLCELLNQLMKFEPTCLEKYPRLKAYLSRFENLPALRDYM
 ASKEFKTRPCNGASAKWRGDC

Antigen S EPITOPE

EFVDINIASKVADAFQKNKEKITTDDKLGTALEQVASQSEKAAPQLSKMLTEASDVHQRMATARK
 NFNSEVNTTFIEDLKNFLNTTLEAQKAKTKLEEVRLDLDSDKTKLKNAKTAEQKAKWEAEVRKD
 ESDFDRVHQESLTIFEKTCKEF.

Tropomyosine

MDSIKKKMMAMKLEKENALEKAINLENQLKEKAKDFEKKEEEMNDWLSKVKNIQTEVDTVQESLQEAISKLE
 ETEKRATNAEAEVAAMTRRIRLLEEDFEQSSGRLTETSTKLDDASKAAEESERNRKTLETRSISDDERMAQLEE
 QVKEAKYIAEDAERKYDEAARRLAVTEVDLERAESRLETSESKIVELEEEELRIVGNMKSLEVSEQESLQREES
 YEETIRDLTERLKTAEQRAAEAERQVSKLQNEVDRLEDELLSEKERYRAISGELDTTFAELTSF

Enolase

MSILKIHARQIFDSRGNPTVEVDLTTSKGLFRAAVPSGASTGVHEAVELRDADKNA YMGKGVL
 NAVKNVNEVIAPALIKEKFVVTDDQQRIDEFMIKLDGSPNKGKLGANAILGVSLAVCKAGAAEK
 GVPLYRHVADLAGNKDVVLPVPSFNVNLGGSHAGNKLAMQEFMILPTGAKSFSEAMKMGTEV
 YHHLKSVIKGKYGLDACNVGDEGGFAPNIQDNMEGLELLKTAIDKAGYTGKVKIGMDVAASE
 FYQDGNYNLDFKNPKAAASSIVSGSKLSDIYSEMISKYPIVSIEDPFDQDDWAAWTEFNAKAGIQ
 IVGDDLTVTNPERVQQAIDRKACNALLLVNQIGSVTESIKACKMSRAAGWGMVSHRSGETE
 DSTIADIVVGLRTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIEELGPKAVYAGEHFRNPL

Paramyosine

MSESHVKISRTIIRGTSPSTVRLESPVRELEDDLDERDARVRSERNANELSIQLDTMTERLDELS
 GTSSQTQDAIRRKDMEIANVRKDLENANA AFETA EATLRRKHNTMISEISSEVENLQKQKGRAE
 KDKSQMLLEIDNVLGQLDGALKAKASAESKLEGLDSQLTRLKALTDDLQRQMADVNSAKSRL
 AAENFELVRVNQEYEAQVVNFSKTKSVLEGQLDDLKRAMDEDARNRLNLQTQLSSLQMDYD
 NLQARYEEEEAEAAGNLRNQVAKFNADMAALKTRLERELMAKTEEFEELKRKLTVRITELEDIA
 EHERTRANNLEKTKVKLTIIEIKDLQAENEALAAENGELTHRAKQAENLANELQRRVDEMTVEI
 NTLNSANNALEGDNMRLKGQVGDLDRIANLDRENRLQDQDKETKSALRDANRRLTDLEAL
 RSQLEADGDNLASALHDAEEALKELEVKYVASQNALNHLKSEMEQRLREKDEELENLRKSTTR
 TIEELTTTISEMEVRFKSDMSRLKKKYEATISELEVQLDVANKANASLNRENKALAQRVQELQT
 ALEDERRAREAAESNLQVSEKRIALTSEVEEIRSQLELSDRARKNAESELNDANGRISELTMSV
 NTLTNDKRRLEGDIGVMQGDLDLDEAVNARKAAEDRADRLNAEVLRLADELRQEENYKRAETL
 RKQLEIEIREITVKLEEAFAFATREGRRMVQKLQNRVRELEAELDGEIRRAKEAFASARKYERQF
 KELQTQSEDDKRMILELQDLLDKTQIKMKAYKRQLEEQEEVSQLTMSKYRKAQQQIEEAHRA
 DMAERTITIKRTIGGPGSRAVSVVREINSVSRGNRATSIM.

Figure 28: Les séquences d'acides aminés des protéines antigéniques les plus importantes identifiées dans les liquides hydatiques fertiles (LHP, LHV). Les épitopes ont été identifiés selon la base de données des épitopes d'*E. granulosus* "Immune Epitope Database and Analysis Resource".

III.5. Étude comparative du profil d'expression des protéines exprimées par les protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques de différentes localisations

Compte tenu de la différence observée dans l'expression des protéines dans les liquides hydatiques fertiles. Il nous a semblé intéressant de comparer l'expression des protéines au niveau des protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques de localisations différentes et de situer la relation entre cette expression et la variabilité antigénique de l'hydatide.

III.5.1. Application de la 2DE à l'extrait protéique de protoscolex

L'application de la 2DE aux extraits solubles de protoscolex sur un gel pH 3-11 a permis d'observer dans un premier temps l'apparition de protéines du côté basique du gel.

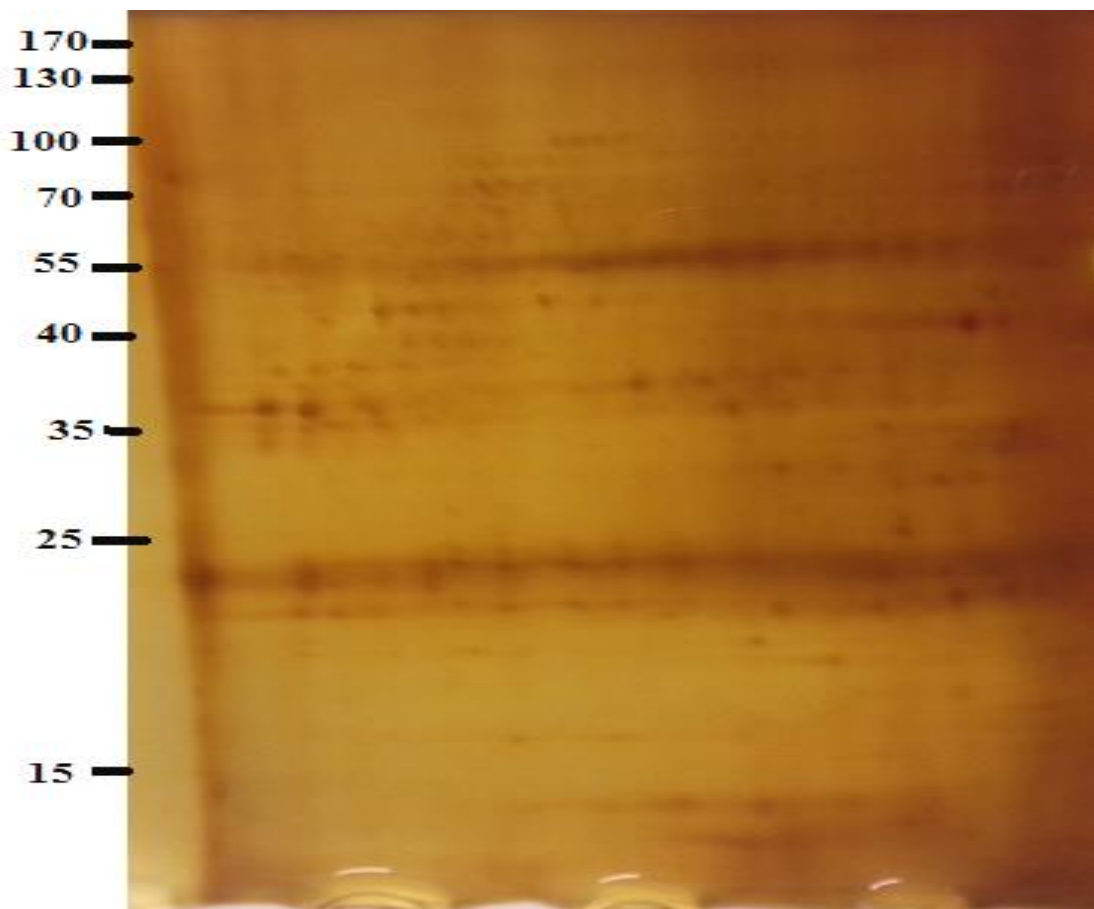


Figure 29 : Profil électrophorétique d'une 2D de l'extrait protéique de protoscolex obtenus à partir d'un liquide hydatique pulmonaire coloré avec le nitrate d'argent.

Les spots protéiques correspondant à un poids moléculaire proche de celui de la sérumalbumine suggèrent que le protoscolex adsorberait l'albumine ainsi que les autres protéines sériques de l'hôte.

III.5.2. Étude de la variabilité protéique d'extraits de protoscolex d'*Echinococcus granulosus*

De manière intéressante, nous avons observé une différence dans le profil électrophorétique des protéines solubles du protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques pulmonaires différents.

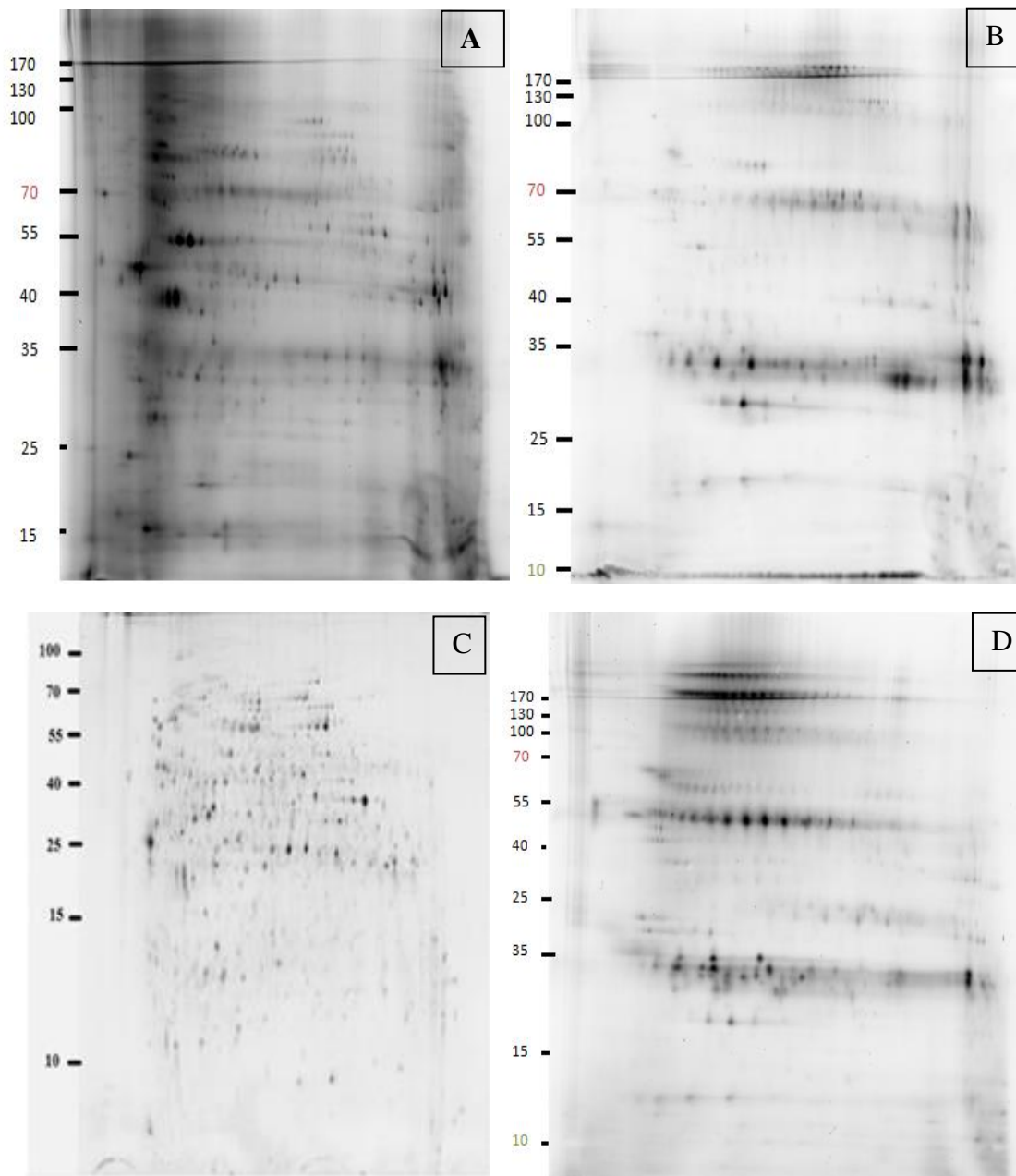


Figure 30: Profils obtenus de la 2-DE des extraits protéiques solubles de protoscolex obtenus à partir de kystes hydatiques pulmonaires différents en utilisant un strip de 18cm, pH 3-11 dans la première dimension suivie d'une seconde dimension sur un gel SDS-PAGE à 12% (gel Serva® de 20x20 cm). **A et D:** Les protéines sont marquées avec le fluorophore Cy5; **B et C:** Les protéines sont marquées avec le fluorophore Cy3.

III.5.3. Étude de la variabilité protéique de deux extraits solubles de protoscolex selon la localisation kystique

Dans ce sens, nous avons réalisé une électrophorèse type "DIGE" (Differential Gel Electrophoresis) afin de comparer deux extraits protéiques de protoscolex. Les extraits de protéines solubles de protoscolex d'origine humaine ont été comparés par marquage de deux extraits protéiques de protoscolex obtenus à partir de deux kystes de localisations différentes (pulmonaire et vertébrale) et soumis à une 2DE sur un même gel (18cm, pH 3-11).

Les protéines ont été marquées avec deux fluorophores différents le Cy3 et le Cy5 pour le liquide hydatique vertébral et pulmonaire respectivement. La variabilité protéique de deux extraits protéiques de protoscolex a été observée sur un gel 2DE (électrophorèse bidimensionnelle) à l'aide d'un système d'image le Typhoon® (**Figure 31**).

Les résultats ont montré une distribution des "spots" du pI acide au pI basique. Nos observations indiquent l'absence de concordance dans l'expression des protéines. La variabilité protéique observée suggère l'implication probable de souches différentes infestant l'homme.

Dans le contexte de notre étude, la variabilité rapportée orienterait vers une diversité antigénique conduisant à une différence dans les niveaux de l'immunostimulation engendrant probablement une différence dans la production du NO.

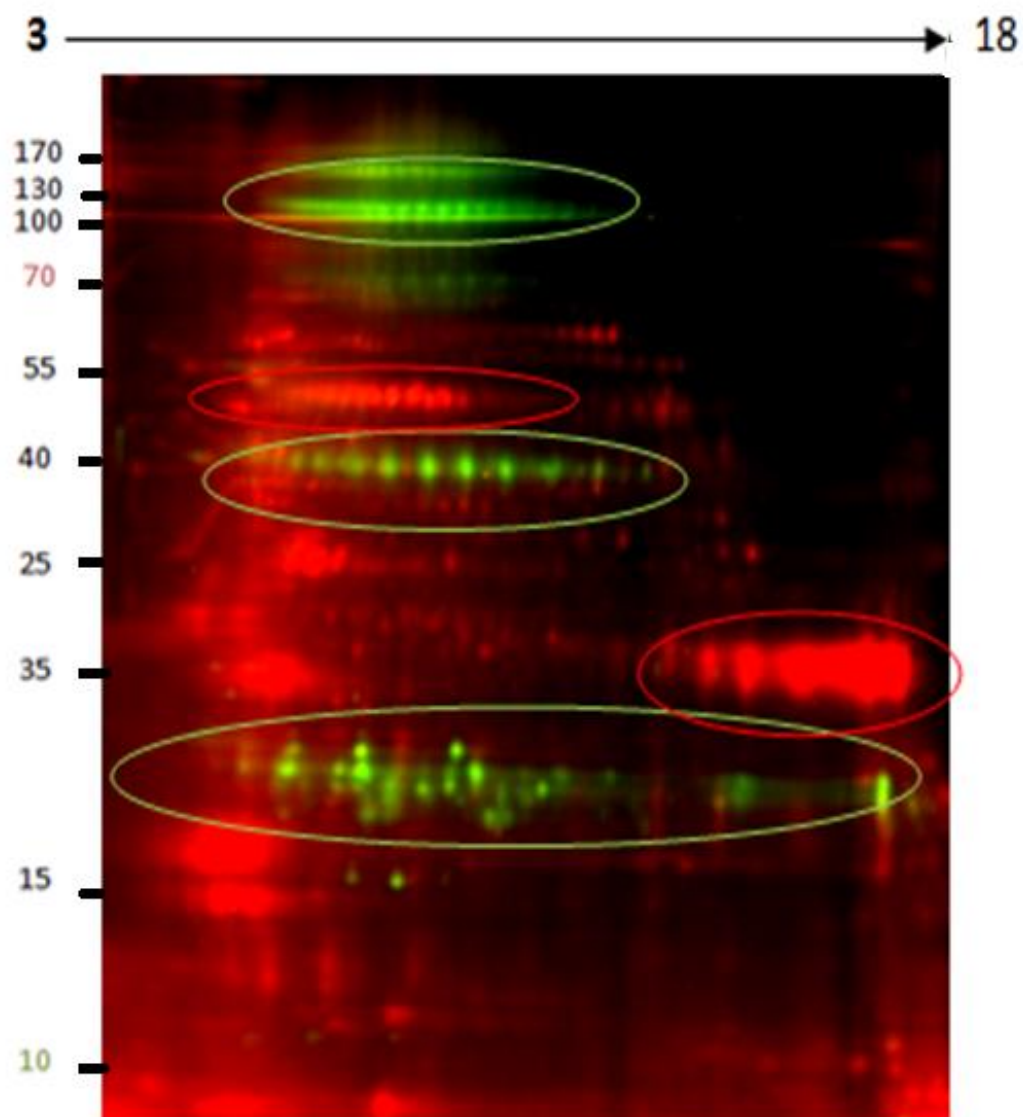


Figure 31: Profil électrophorétique d'une DIGE pour la comparaison entre deux extraits protéiques de protoscolex d'origine humaine de localisation pulmonaire et vertébrale en utilisant deux fluorophores (Cy3: Protoscolex obtenus à partir d'un kyste hydatique vertébral (rouge), Cy5: Protoscolex obtenus à partir d'un kyste hydatique pulmonaire (vert). L'image est prise par imager Typhoon®.

III.6. Caractérisation protéomique de la couche laminaire

L'étude de la composition protéique de la couche laminaire permettrait d'apporter des informations sur l'interaction hôte/parasite à l'interface du macroparasite. L'extrait soluble des protéines de la couche laminaire a été soumis à un SDS-PAGE. Les bandes apparentes ont été coupées et digérées à la trypsine. Les peptides obtenus sont analysés par LC- MS/MS puis identifiés en utilisant le logiciel MASCOT® et la base de données "NCBI all" selon les paramètres suivants: Enzyme: Trypsine, le nombre maximal de sites de clivage manqués:1; modifications fixes: Carbamidomethyl (C); modifications variables: Oxidation (M), masse peptidique tolérée: 200ppm).

L'analyse protéomique de l'extrait protéique de la couche laminaire a permis d'identifier des protéines de l'hôte impliquées dans la réponse immunitaire (**Tableau 19**) et deux protéines parasitaires (**Tableau 20**). Ces données indiquent l'instauration d'une réponse inflammatoire locale au site d'interaction hôte/parasite (CRP), le C9 du complément, " Ig lambda chain C region". D'autres protéines ont été également identifiées (**Tableau 21**).

Tableau 19: Identification des protéines de l'hôte extraites à partir de la couche laminaire.

Nom de la protéine	MASCOT® score	Fonction moléculaire/processus biologique
La protéine C réactive	253	Réponse inflammatoire
C9 du complément	82	Réponse immunitaire innée
Hémoglobine sous unité bêta	213	-
Hémoglobine alpha	132	-
Apolipoprotéine 1 (ApoA-1)	153	Liaison au cholestérol/réponse inflammatoire
L'Actine		Protéine de Structure
Fatty acid binding protein	116	Homéostasie du cholestérol
Albumine	62	Transport
Ig lamda chainC region	108	-

Tableau 20 : Identification des protéines parasitaires dans l' 'extrait protéique de la couche laminaire

Nom de la protéine	Espèces	MASCOT®score	Fonction moléculaire/processus biologique
Glioma pathogenesis protein 1	<i>E. multilocularis</i>	108	-
Annexine	<i>E. granulosus</i>	247	Fixation du calcium

Tableau 21 : Autres protéines identifiées au niveau de la couche laminaire

Nom de la protéine	Espèces	MASCOT® score	Fonction moléculaire/processus biologique
Larval specific keratine RLK	<i>Rana catesbeina</i>	82	Structure
Glutéline	<i>Oryza sativa</i>	160	Nutrition
prepro-glutéline	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	104	--

Selon nos conditions expérimentales, nous avons observé un bruit de fond au niveau des spectres, ce qui pourrait expliquer probablement la nature muqueuse et visqueuse des membranes kystiques. Les propriétés visco-élastiques sont principalement dues aux mucines. La coexistence de toutes ces protéines biologiquement actives est en faveur de l'instauration d'une interaction hôte /parasite évolutive agissant dans la longévité de la parasitose.

III.7. Étude comparative de l'antigénicité de la couche laminaire hydatique

La couche laminaire est constituée des molécules issues de l'activité métabolique de la membrane germinative et des protoscolex (produits de sécrétion et d'excrétion). Compte tenu, de la différence dans la fertilité des kystes hydatiques pouvant engendrer une variabilité dans la composition de la couche laminaire, nous avons tenté à travers l'utilisation du Western blot de comparer l'antigénicité de deux membranes laminaires extraites de deux kystes hydatiques différents (un kyste pulmonaire fertile et un kyste paravertébral infertile).

À travers l'immunoblot que nous avons réalisé, le profil obtenu a montré une luminescence dans les fractions de haut poids moléculaire. Nous suggérons que la présence des protéines de l'hôte adsorbées à la surface des membranes kystiques pourrait atténuer l'antigénicité de ces fractions.

III.7.1. Profil SDS-PAGE de L'extrait protéique de couches laminaires de différentes localisations

Les résultats obtenus par "SDS-PAGE" ont montré une variation dans le profil des différents extraits protéiques obtenus à partir de kystes hydatiques fertiles (CLP1, CLP2, CLV) et infertile (CLPV) indiquant une différence dans la composition des couches laminaires (**Figure 32**). Nous avons également observé une différence pour la même localisation. Cette différence pourrait orienter vers une différence dans l'immunogénicité et notamment dans les niveaux de sollicitation antigénique. Elle est différente dans sa composition globale, d'un kyste à un autre. Ces données pourraient expliquer les différences rapportées dans les processus d'immunostimulation. En effet, il a été rapporté que la membrane laminaire réduirait la production du monoxyde d'azote. Dans ce sens, nous avons tenté d'étudier l'antigénicité de deux couches laminaires, une issue d'un kyste pulmonaire fertile et l'autre issue d'un kyste hydatique paravertébral infertile.

III.7.2. Comparaison de l'antigénicité de la couche laminaire selon la localisation et la fertilité

Dans ce sens, nous avons tenté de comparer l'antigénicité de deux couches laminaires, la première a été obtenue à partir d'un kyste pulmonaire fertile, la deuxième couche laminaire provient d'un kyste hydatique paravertébral infertile.

Les bandes apparentes ont un poids moléculaire de 100 kDa, bande comprise entre 35 et 25 kDa, et au niveau de la bande 15 kDa. Nous n'avons pas observé de différence entre les patients après chirurgie. Nos données sont en faveur de la persistance des IgGs.

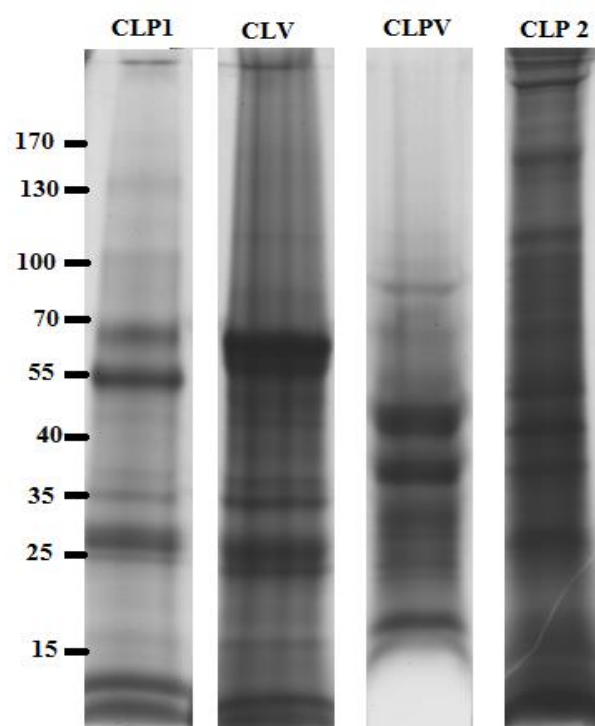


Figure 32: “SDS – PAGE” des protéines extraites des couches laminaires (20 µg) après coloration avec le bleu de Coomassie. Les marqueurs de poids moléculaire sont indiqués à gauche du gel. **CLP1:** Couche laminaire pulmonaire 1; **CLV:** Couche laminaire vertébrale; **CLPV:** Couche laminaire paravertébral; **CLP2:** Couche laminaire pulmonaire 2.

Le Western blot réalisé sur les deux couches laminaires, vertébrale et pulmonaire a montré une différence marquée dans l’antigénicité des extraits protéiques de ces couches, néanmoins des bandes communes ont été observées (**Figure 33, 34**). Le profil obtenu relatif au western blot de la couche laminaire vertébrale a montré l’apparition de la luminescence au niveau des protéines répondant à des poids moléculaires de 100kDa et une bande commune située entre 35 et 40 kDa ainsi qu’une bande correspondant au PM de 15kDa .

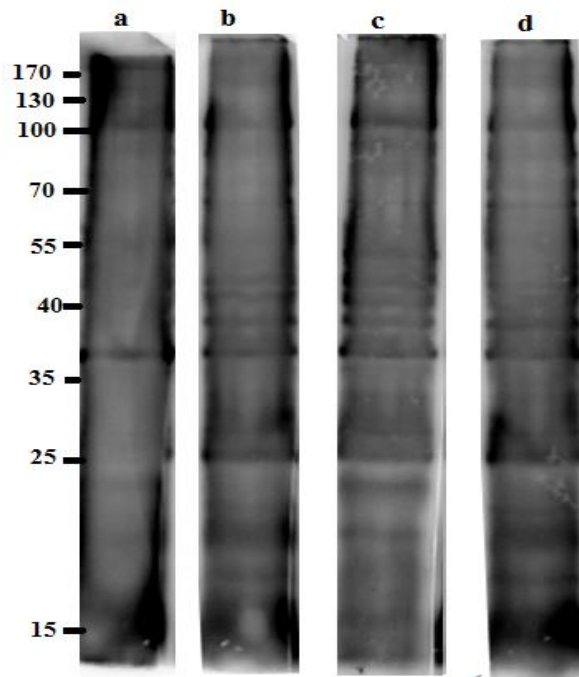


Figure 33 : Étude de l'antigénicité d'une couche laminaire vertébrale par Western blot.
a,b,c,d: sérums de patients hydatiques.

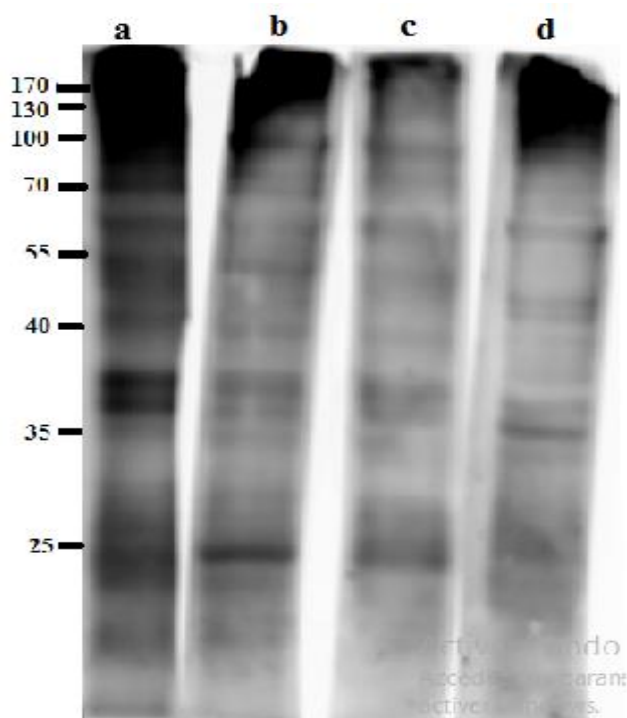


Figure 34: Étude de l'antigénicité d'une couche laminaire pulmonaire par Western blot.
a,b,c, d: sérums de patients hydatiques.

III.8. Recherche *in silico* d'une NOS putative

La recherche d'une NOS putative au niveau d'*E. granulosus* a été effectuée en utilisant le système "search term" sur la base de donnée Uni ProtKB®. Le résultat de la recherche a permis d'identifier la NOS interacting protein (NOSIP) d'*E. granulosus* (**Figure 35**). La fonction moléculaire de cette protéine a été recherchée par le système "gene ontology" (www.gene ontology.org). Les informations relatives à cette protéine indiquent qu'il s'agit d'un régulateur de l'activité de la NOS. "La nitric oxide synthase interacting protein" est une protéine régulatrice de l'activité de la NOS endothéliale, elle régule la production du monoxyde d'azote par induction de la translocation de la NOS1 et la NOS3 envers l'actine du cytosquelette ainsi que l'inhibition de son activité. Ces données suggèrent la présence d'une NOSynthase putative (neuronale ou endothéliale) au niveau d'*E. granulosus*.

```
MTRHSKNCTA NTVYTYHERR KDAKHSGYGT QTVRLGKDSI RAFDCCCLTL
QPAKDPVITQ DGFYDRAAI LEYILSQKAD IKRRQKIYAK QCDRAAREAL
EKKKAAQDEK ARAFMALNTL DTHSKASAQA AESEALASVS KGNCKLTSFE
GDYKPGTAAS FWTQTPSASD SLKHEKDIPK PDPVVRCPMS GKPLRYKDLI
TVNFTNLDVD DAGSGSCNTG ANEIRRVCAV SKDPLTSATR CFVLRPSGAV
VTREVVEKII RKEMIDPISG TKLAESDLIE VRVGC GG FAD GRSVLTASRV
APVMPS
```

Figure 35: Séquence d'acides aminés de la NOS interacting protein (NOSIP) identifiée chez *E. granulosus* (<http://www.uniprot.org/uniprot/U6J9S4>).

Parallèlement, nous avons cherché *in silico* les produits de gènes d'*E. granulosus*. Nous avons identifié la ">EgrG_000456100.1.pep|carboxyl terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide" (**Figure 36**). De manière intéressante, nos résultats confortent les travaux ultérieurs rapportés par **Amri (2012)**. Ils suggèrent la présence d'une NOS constitutive au niveau du protoscolex. Les produits de gènes d'*E. granulosus* ont été vérifiés manuellement sur la base de données génomique d'*E. granulosus* confirmant ainsi la présence d'une NOS constitutive neuronale au niveau d'*E. granulosus*, ce qui explique la présence *in situ* des nitrites dans les liquides hydatiques. L'étude de son rôle au niveau du protoscolex est à considérer dans nos futurs travaux. ([tp://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/Egranulosus_v3_2](http://ftp.sanger.ac.uk/pub/project/pathogens/Echinococcus/granulosus/genome/Egranulosus_v3_2)).

Dans ce sens, la recherche *in silico* d'une NOS putative a permis d'identifier la présence d'une part la NOS interacting protein (NOSIP) chez *E.granulosus* (EgrG_000625000 pathogen_EgG_scaffold_0003/product="nitric oxide synthase interacting protein). De plus, nous avons cherché les produits de gènes d'*E.granulosus* et nous avons également identifié la >EgrG_000456100.1.pep|carboxyl terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase. Nos données confirment la présence d'une NOS constitutive

```
MEVPRPQNRLEIVSSMRRIRYEFKAKGVKKQKALKVSADGVVYVYGRNPKPKVVGTRLSSA
LSKISGSTTPVPTEIPTSMNMEVGGTGGPQTPSSPSCHSGSNGGGLLGLGLRNASALSCV
HPANVILFHPITYRIFYVSHDSQDLKIFSYIARDGKSSCFKCYVFKAYKKLQAMRIVRTVG
QAFDVCHRLALQKQENDQASKKSDEGQTAGGGDSFHHTLPHRRKPLQONHRSQSPPIGEN
SSDENEWHSPPRRRRHRTRRNKNCSSDEDPGKNGREDRARSVIYSEEASDEDSDKQPITPLTL
KKVKAASGLRRRRHRAFSSNNGDASSDSSDVPRRYPRSHIKQSITNDDFLAWDRFGHGLG
YPTPISLPLFLGFPQSQSLDTNLAREILCGSSTHSVQSQSSIPPDPVLLSRLLSLSELQGSLT
SDQPVVSKEKQRQSDSMSWVPYLGGRVGTLSLSETHDSLIRQLDILGAKMTRTCKNDLRSVS
SYQLSKEASNSGDPTMGIPISITAPNLASTPADSAKLEEKVANSETVLSTETLDVLRKQL
NIQETETKIAIYQVHRLMRQLRLEAAARMEGQYRIEQLINQNRNLSEGFOKMALRLKRLE
NLSPPVPATSISKVSNVSSVASPRTSSHFPPQSTYSGSKSEGFSRLAELDAMVQNMLSP
GSRHQSLRKTSSSGHTVQGQLSLSGSPKLPPLSPLQSGRSGIANNGTRLSGTENSSSSPGG
SNSLSLPPPLQMPYRSPGGEDGFLELATRSSVPNDEKVSTCNWVDECFGRTAENQAGKGN
NPMELLFEPFRGQEELSGLLPPTPPARVPSAVNGGNPWAVDAAAIAAEKESQKKPINL
PVEDLETPTPKFLFPKIQLAFTFRPATIISTFFIALSTHYFPSPQPLDLVCLLC
```

Figure 36: Séquence d'acides aminés du PDZ neuronal nitric oxide.

(Recherche sur NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/576698788>)

Ces données mettant en exergue la présence d'une NOS parasitaire ont été soutenues par des expériences entreprises *in vitro*. En effet, la mise en culture de protoscolex en présence de 10mM de L-arginine selon un nombre croissant de protoscolex 50, 100, 200, 400,800, 1000 PSC/ml a montré une corrélation entre le nombre des protoscolex et le taux des nitrites mesurés (**Figure 37**).

De plus, l'addition de chlorure de potassium a entraîné une diminution dans la production des nitrites suggérant la dépendance de l'activité NOS envers le calcium au niveau du protoscolex, caractéristique majeure des NOS constitutives (**Figure 38**).

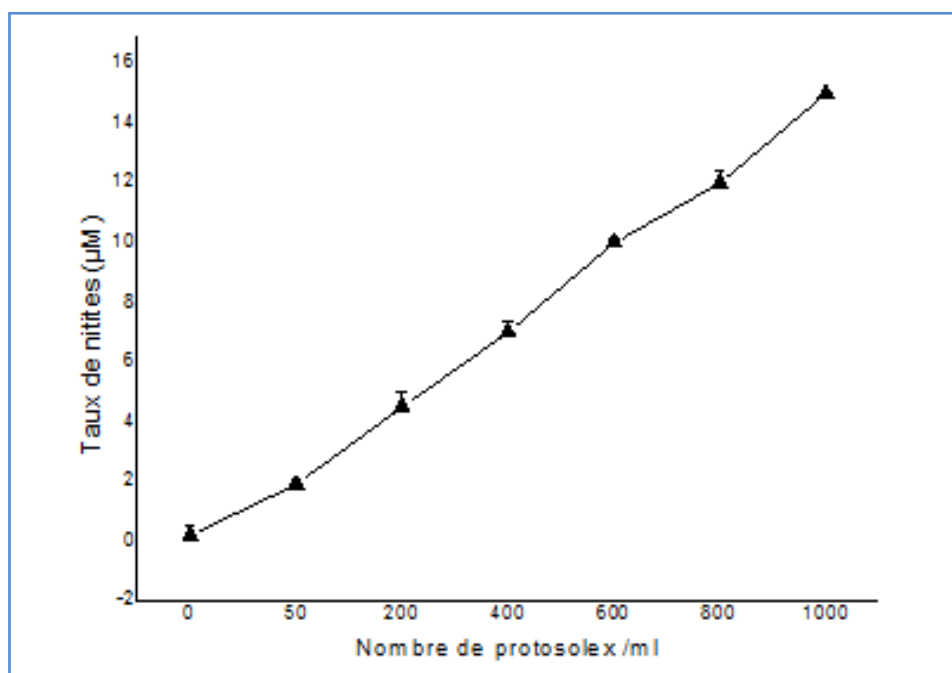


Figure 37: Évolution de la production des nitrites en fonction du nombre de protoscolex en présence de 10mM de L-arginine.

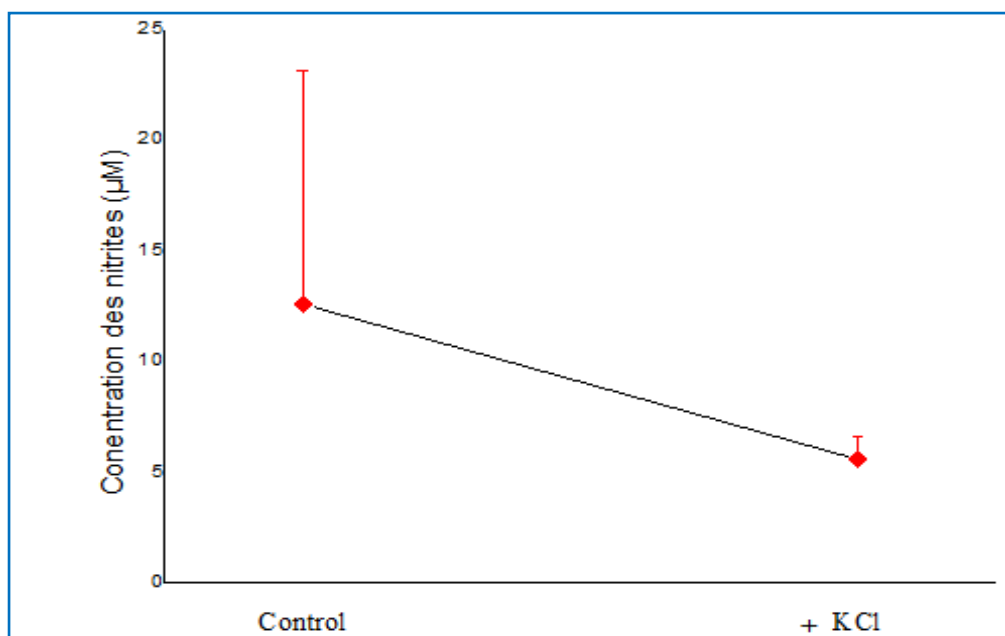


Figure 38: Effet *in vitro* du chlorure de potassium (10µM) sur la production des nitrites par les protoscolex .

III.9. Étude histopathologique de biopsies d'un poumon affecté par un kyste hydatique

Compte tenu des teneurs élevées en nitrites retrouvées au niveau des sérums des patients hydatiques, il nous a semblé intéressant de situer la corrélation entre l'augmentation des taux de NO et les lésions histologiques.

Le parenchyme pulmonaire sain est caractérisé par la présence d'alvéoles sous forme de cavités plus ou moins polygonales de diamètre variable (**Figure 39. A**).

L'existence de lésions inflammatoires chroniques limitées a été recherchée à travers une étude histologique des biopsies de poumons humains. Les observations microscopiques des coupes histologiques ont montré une altération du tissu pulmonaire avoisinant le kyste hydatique. La présence de ce dernier provoque une compression au niveau du parenchyme avoisinant le kyste hydatique entraînant ainsi un rétrécissement des espaces alvéolaires (**Figure 39B**). L'adventice est de nature fibreuse épaisse. La larve hydatide est constituée de deux couches, une membrane interne germinale très riche en noyaux cellulaires et une couche externe laminaire stratifiée (lamelles concentriques), ces deux couches sont accolées l'une à l'autre. (**Figure 39D**). (**Figure 39E**).

III.10. Étude de l'effet *in vitro* des métabolites du NO (nitrite, nitrate et peroxynitrite)

Compte tenu de la différence observée dans le profil d'expression des protéines du protoscolex, et des variations dans la taille des protoscolex observée dans certains liquides hydatiques fertiles, nous avons testé l'effet direct des dérivés du NO: nitrite (NO_2^-), nitrate (NO_3^-) et peroxynitrite (ONOO^-) sur la viabilité des protoscolex et l'intégrité des membranes kystiques.

III.10.1. Étude de l'effet scolicide du NO *in vitro*

La culture témoin des protoscolex, a montré une évolution progressive de la forme invaginée vers la forme dévaginée. Cette dernière est caractérisée par l'apparition de deux régions: une région apicale constituée de la couronne de crochets et des ventouses, et une région caudale ou le soma. Les protoscolex viables ont montré une mobilité apparente (**Figure 41.A**).

Les nitrates ne montrent pas d'effet scolicide et semblent inefficaces sur la viabilité des protoscolex, même à une concentration de 500 μM . Les parasites gardent leur mobilité et évoluent d'une manière progressive du stade protoscolex invaginé au protoscolex dévaginé.

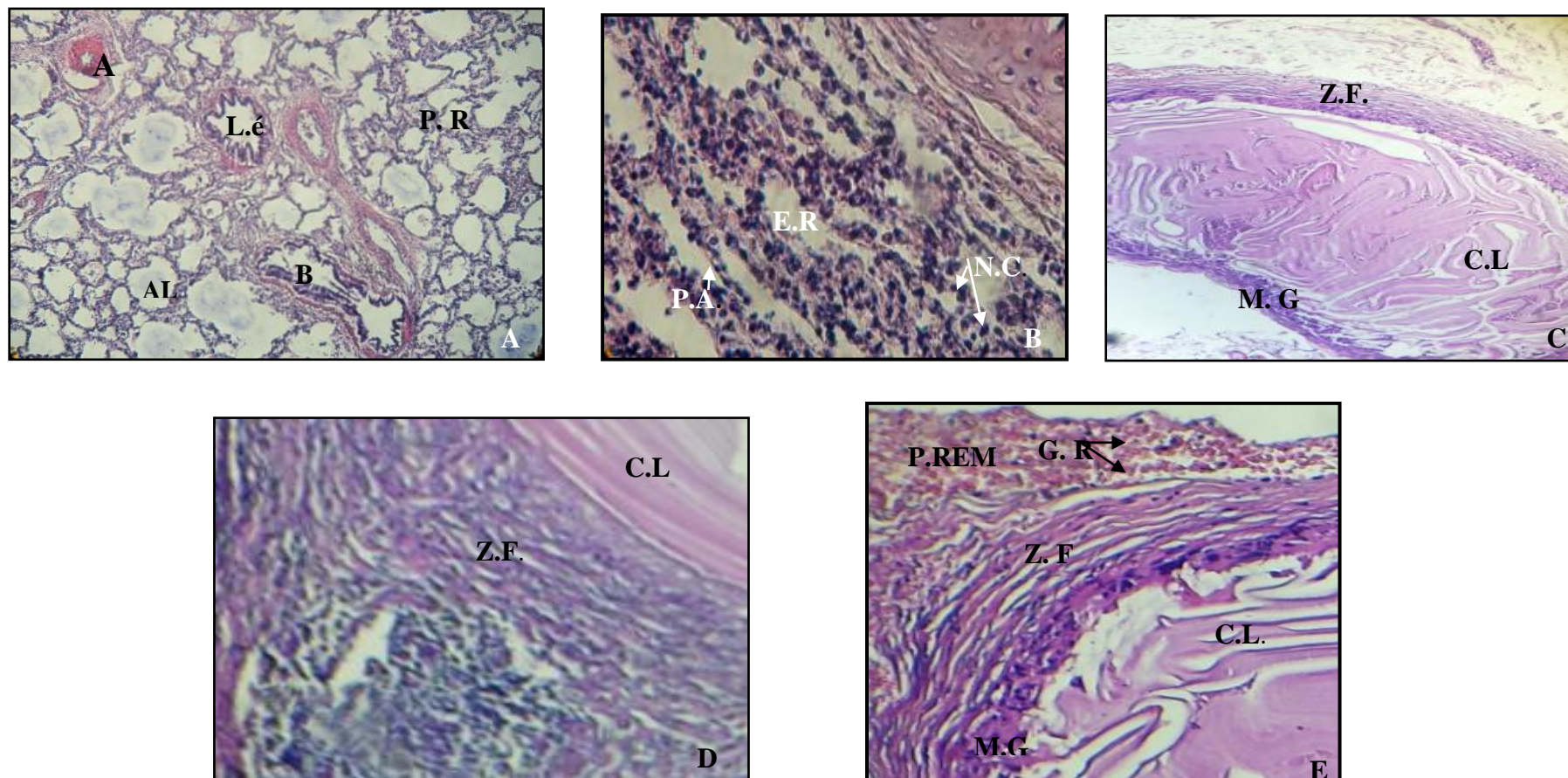


Figure 39 : Coupes histologiques d'une biopsie de poumon humain observées au microscope optique après coloration à l'hématoxyline éosine.

A: Tissu sain; **B, C, D, E:** Tissu affecté par la larve hydatique; **A:** Artère; **B:** Bronche; **L.é.:** Lumière étoilée; **A.L.:** Alvéole;

E. R.: Espace alvéolaire rétréci; **P.A.:** Paroi alvéolaire; **N.C.:** Noyaux cellulaires; **M.G.:** Membrane germinative; **C.L.:** Couche laminaire; **Z. F.:** Zone fibreuse; **P. REM.:** Parenchyme remanié; **G.R.:** Globules rouges. **A, C:** GX10; **B, E:** GX20; **D:** GX40.

L'analyse statistique a montré qu'il n'existe pas de différence significative entre le taux de viabilité des protoscolex incubés dans différentes concentrations de nitrite pendant 24 heures ($p=0,9$).

L'effet scolicide des nitrites apparaît après 24 heures d'exposition en présence de 320 μM de nitrites. Il est caractérisé par la perte de la mobilité des protoscolex et par la turgescence de certains protoscolex et la rétractibilité des autres, ces deux effets sont observés pour les deux formes (invaginée et dévaginée). La structure des protoscolex est altérée. Les corpuscules calcaires sont libérés dans le milieu extérieur. La présence de couronnes de crochets libres dans le milieu de culture indique leur détachement et la destruction du tégument (**Figure 41.C**).

Par ailleurs, le peroxy-nitrite a montré un effet scolicide à une concentration de 80 μM affectant à 100% la viabilité des protoscolex après 3 heures d'exposition. L'effet scolicide est traduit par une altération de la structure interne du protoscolex associée à un brunissement au niveau de la zone de crochets. La taille de la couronne de crochets apparaît plus réduite (**Figure 41.D**). La structure des ventouses est également altérée. En présence d'une concentration de 40 μM , le taux de viabilité des protoscolex atteint 50% après 24 heures d'incubation à 37°C (Figure 40).

L'analyse statistique (ANOVA) révèle une différence significative entre le taux de viabilité des protoscolex incubés pendant 24 heures en présence de différentes concentrations du peroxy-nitrite ($p = 0.00001$)

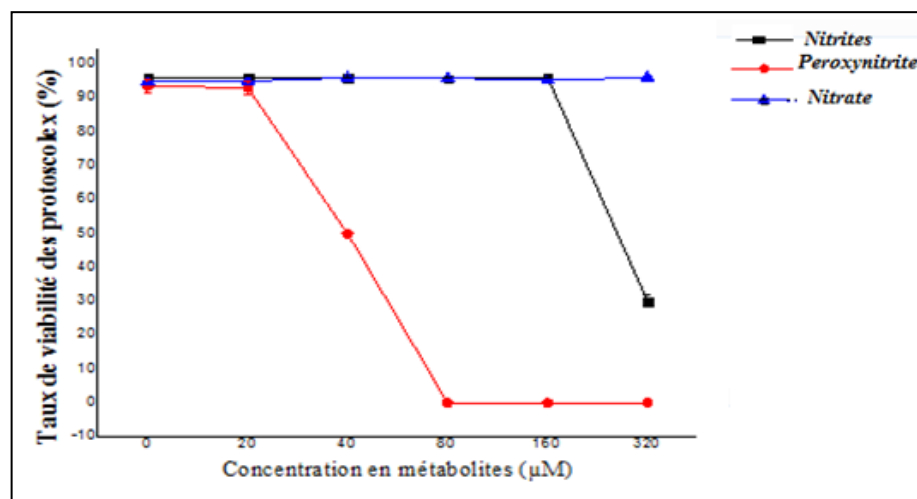


Figure 40: Effet *in vitro* des métabolites du NO (Nitrites, peroxy-nitrite et nitrate) sur la viabilité des protoscolex après 24 heures d'incubation à 37°C dans le milieu DMEM enrichi avec 10% de SVF.

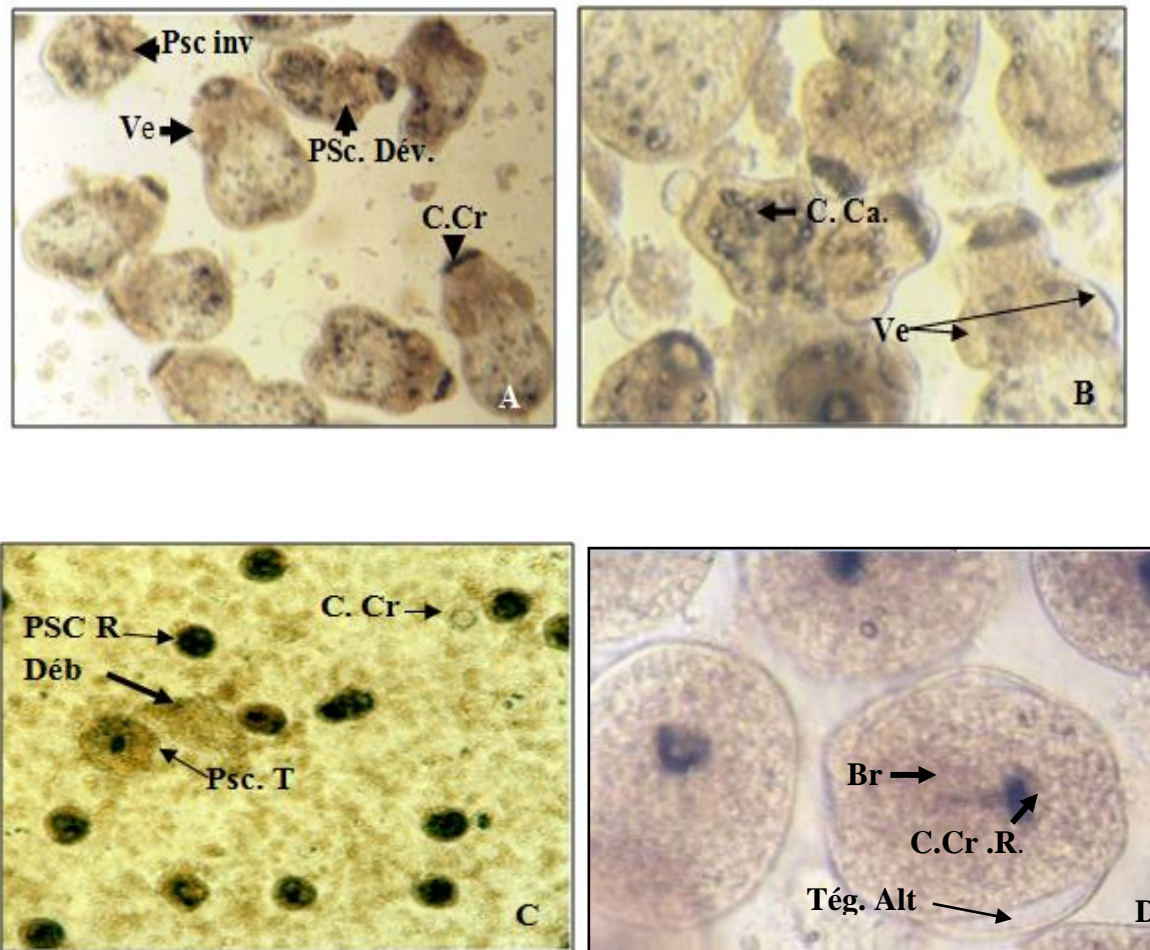


Figure 41: Effet *in vitro* des métabolites de NO sur les protoscolex observés sous microscope à phase inversée

A: Morphologie des protoscolex après 24 heures d'incubation à 37°C dans le milieu DMEM enrichi avec 10% de SVF (culture témoin) (GX20); **B:** Morphologie des protoscolex dans 320µM de nitrites après 12 heures d'incubation (GX20); **C:** Morphologie des protoscolex mis en culture en présence de 320µM de nitrites après 24 heures d'incubation. (GX10). **D:** Morphologie des protoscolex mis en culture en présence de 80 µM de peroxynitrite après 3 heures d'incubation (GX20).

PSC. inv: Protoscolex invaginé; **PSC. Dév:** Protoscolex dévaginé; **C. Ca:** Corpuscules calcaires; **Ve:** ventouses; **PSC:** Protoscolex; **PSC. R:** Protoscolex rétracté; **PSC. T:** Protoscolex turgescent; **Déb:** débris tégumentaires. **C. Cr:** Couronne de crochets; **Br:** Brunissement; **C. Cr.R:** Couronne de crochets rétractée; **Tég. Alt:** Tégument altéré.

Sous microscope inversé, la couche laminaire non traitée est caractérisée par un aspect lamellaire donnant un aspect strié conservé (**Figure 43A**). La membrane germinative est accolée sur cette couche. Elle est constituée de plusieurs territoires cellulaires de cellules indifférenciées. Elle apparaît réfringente à la lumière (**Figure 44 A.**).

Les nitrites et le peroxy-nitrite ont montré un effet dégénératif sur la couche laminaire et la membrane germinative (**Figure 43, 44**). Dans le même sens, l'action dégénérative du peroxy-nitrite sur la membrane laminaire est traduite par un brunissement progressif qui s'intensifie en fonction de la concentration du peroxy-nitrite et du temps d'exposition. (**Figure 42**). Sous microscope inversé, l'effet dégénératif est traduit par la perturbation de l'aspect lamellaire de la couche laminaire (**Figure 43C**). L'aspect réfringent de la membrane germinative est perdu et devient dense. Ces altérations sont associées à un brunissement indiquant une dégénérescence des membranes kystiques. Les premières modifications associées à l'effet du peroxy-nitrite apparaissent après 15 minutes d'incubation en présence de 80 μM du peroxy-nitrite (ONOO^-).

De plus, nous avons également observé des débris de la membrane germinative dans le milieu de culture indiquant des altérations affectant les membranes kystiques conduisant ainsi au détachement de la membrane germinative de la couche laminaire (**Figure 45**).

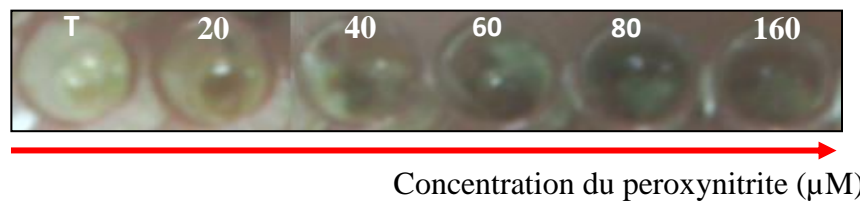


Figure 42: Effet *in vitro* du peroxy-nitrite sur la couche laminaire présentant un brunissement en présence de différentes concentrations croissantes de peroxy-nitrite après 48 heures d'incubation à 37°C. **T:** Culture témoin

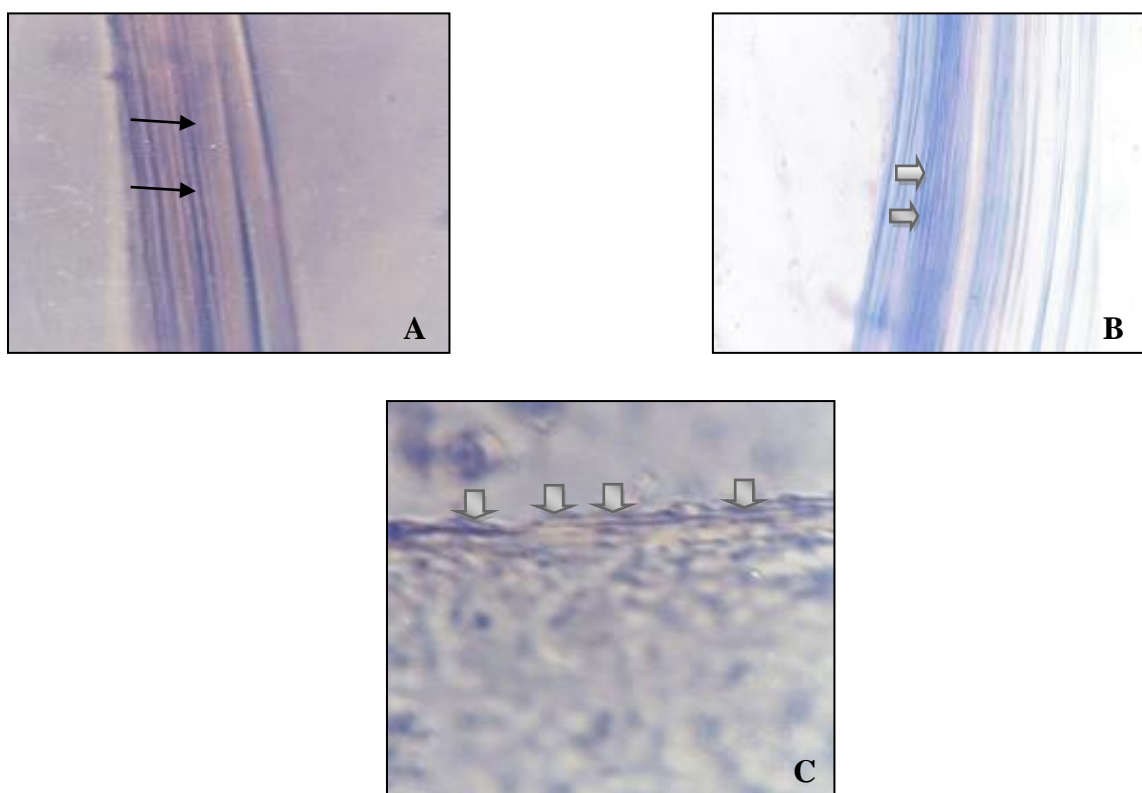


Figure 43: Effet *in vitro* des métabolites de NO sur l'intégrité de la couche laminaire observée sous microscope inversé.

A: Aspect de la couche laminaire (culture témoin), (Gx20).

B: Structure dense de l'aspect lamellaire indiquant un début de perturbation des lamelles après 30 minutes d'incubation (Gx20) en présence de 320 µM de nitrites.

C: Altération de l'aspect lamellaire et strié de la couche laminaire après 30 minutes d'incubation en présence de 80 µM de peroxy-nitrite. (Gx10).

→: Lamelles; ⇨: Perturbation de la structure lamellaire.

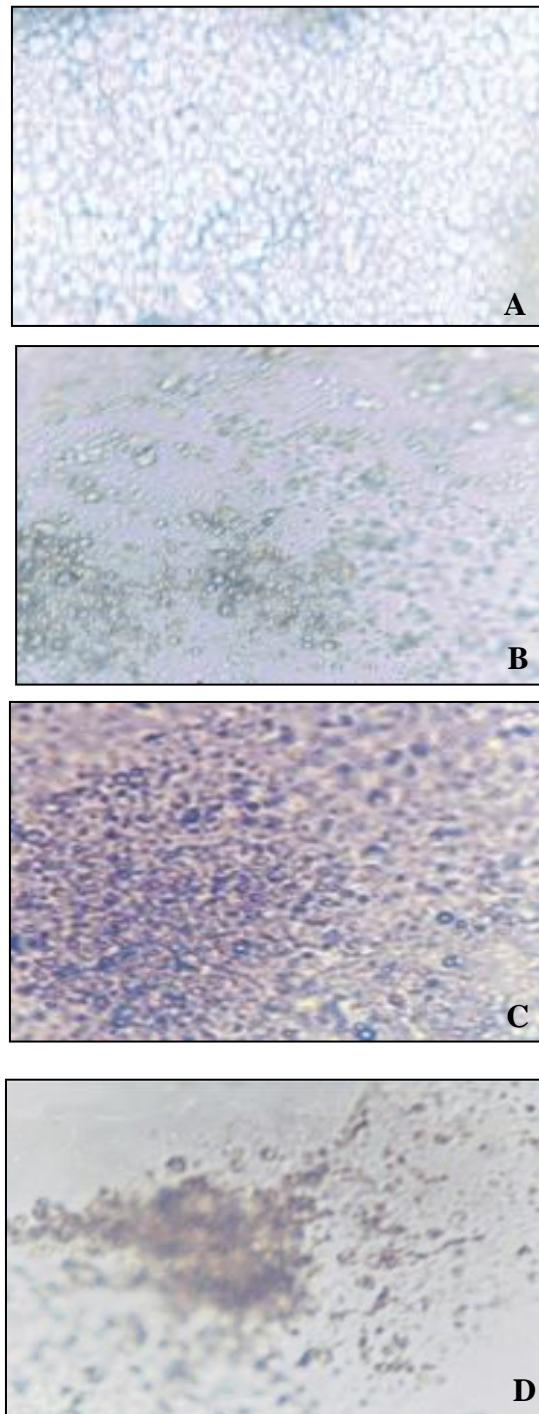


Figure 44: Effet *in vitro* des nitrites sur la membrane germinative observé au microscope inversé(GX20). **A:** Membrane germinative viable réfringente à la lumière (Culture témoin); **B:** Aspect de la membrane germinative après 12 heures d'incubation en présence de 160 μM de nitrites; **C:** Brunissement de la membrane germinative après 24 d'incubation en présence de 320 μM de nitrites; **D:** Débris de la membrane germinative observés dans le milieu de culture après 48 heures d'incubation.

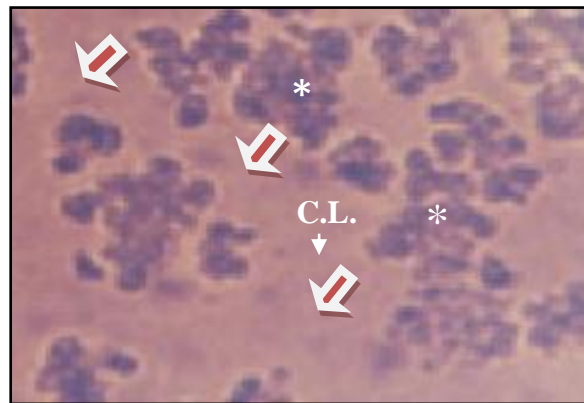



Figure 45: Aspect des membranes kystiques en culture en présence de 320 μM de nitrites après 48 heures d'incubation.

*: Membrane germinative altérée accolée sur la couche laminaire; **C.L.:**Couche laminaire; : Zone dépourvue de la membrane germinative.

La comparaison de l'effet *in vitro* des métabolites du NO sur la viabilité des protoscolex et l'intégrité des membranes kystiques a montré que le peroxy-nitrite est hautement cytotoxique dont l'effet a été observé à une concentration inférieure que celle des nitrites et des nitrates. Alors que les nitrates n'ont pas montré d'effet, même à une concentration de 500 μM . Ces résultats confirment le rôle des nitrites et du peroxy-nitrite dans l'action anti-hydatique (Zeghir-Bouteldja et al., 2009).

DISCUSSION

DISCUSSION

Les travaux entrepris au cours de notre thèse ont permis d'obtenir une première vision intégrée de la relation établie entre le stade larvaire d'*Echinococcus granulosus* et son hôte intermédiaire. Cette relation met en jeu des mécanismes moléculaires déployés par le marcoparasite pour se protéger des effecteurs cellulaires et solubles du système immunitaire notamment le monoxyde d'azote. Cependant, la réponse immunitaire antihydatique est caractérisée par l'instauration d'une inflammation consécutive à la chronicité de cette affection. Nos travaux précédents ont montré l'implication de la voie NOS2, enzyme induite sous l'action des cytokines pro-inflammatoires, en l'occurrence, l'IFN- γ dans les mécanismes immunitaires vis-à-vis d'*E. granulosus*.

L'étude de la production systémique des nitrites chez des patients atteints d'hydatidose a montré, une variation dans la production de NO (**Touil-Boukoffa et al., 1998; AitAissa et al., 2006; Amri et al., 2009**). Cependant, les taux de NO résultent d'une production complexe (plusieurs NOS synthases, nombreuses sources cellulaires, multiples fonctions locales). La présence de taux significativement élevés de nitrites chez les patients hydatiques constitue un argument fort en faveur de l'implication de NO dans l'action anti-hydatique. En effet, la production de NO serait associée à la stimulation des cellules immunitaires au cours de l'établissement de la parasitose. Dans des études antérieures, nous avons rapporté que l'IFN- γ conduit à la production de taux élevés de NO via la voie NOS2 (**Touil-Boukoffa et al., 1998; Ait Aissa et al., 2006; Amri et al., 2007**). Une corrélation entre la production des nitrites et de l'IFN- γ indique que la production du NO est majoritairement induite par l'IFN- γ . Cependant, cette cytokine Th1 est nécessaire à la "régulation positive" de la production du NO par le système monocyte/macrophage (**Paul-Eugène et al., 1994; Touil-Boukoffa et al., 1998**).

La formation du NO et de ses métabolites stables a été rapportée dans diverses maladies parasitaires. Dans ce contexte, une production importante des nitrites a été détectée dans les sérums de patients infectés par *Entamoeba coli* (**Karaman et al., 2009**). De plus, la schistosomiase humaine induit une augmentation de la production des nitrites sériques (**Ab-Shousha et al., 1999**). L'infection de modèles murins avec *Echinococcus multilocularis* a montré une augmentation dans l'expression de la NOS2 dans les macrophages péritonéaux (**Dai et Gottstein, 1999**). Dans le même sens, l'étude de la production systémique des nitrites chez des patients atteints d'hydatidose a montré une différence significative par rapport à celle détectée chez les individus sains (**Touil-Boukoffa et al., 1998**). Il a été également montré que la production des nitrites dépendait de la localisation anatomique et de la fertilité des kystes

hydatiques (**Ait aissa et al., 2006; Zeghir-Bouteldja et al., 2013**). Toutefois, les concentrations des nitrites diminuent chez les patients après chirurgie en absence des complications post chirurgicales (infection post opératoire). Cette diminution est associée à l'exérèse de la masse antigénique (**Ait Aissa et al., 2006; Parsak et al., 2007**). Nous avons observé des taux élevés de nitrites chez les patients porteurs de kystes intacts et viables comparés à ceux détectés chez les patients porteurs de kystes calcifiés. Cette diminution serait associée à l'inhibition de l'immunogénicité en relation avec le mode de l'évolution de l'échinococcose kystique. En effet la calcification indique la non viabilité des kystes hydatiques. Les taux élevés de nitrites chez les kystes rompus sont probablement associés à une forte stimulation antigénique des cellules immunitaires. Cette observation est soutenue par une hyperéosinophilie marquée après rupture des kystes engendrant des manifestations allergiques et une forte production des IgE qui interagissent avec le CD23 induisant l'expression de la NOS2 (**Paul-Eugène et al., 1994; Kolb et al., 1995; Bell, 1996**).

Compte tenu des localisations kystiques, nous avons observé une forte production des nitrites au cours de l'échinococcose hépatique comparée à celle observée dans les kystes pulmonaires. Cette différence est probablement associée d'une part, à la richesse des kystes hépatiques en antigènes, et d'autre part à la haute vascularisation du foie. Dans ce contexte, **Ait Aissa et al., (2006)** a montré la présence d'une NOS2 dans les hépatocytes et les cellules de Kuppfer au niveau des biopsies de foie obtenues à partir de patients hydatiques. Il a également été rapporté que les PBMCs humaines constituent une source de production de NO (**Touil-Boukoffa et al., 1998; Ait Aissa et al., 2006, Amri et al., 2007**). En effet, la production des taux élevés de nitrites au cours de l'infection hépatique pourrait être corrélée à une activation des cellules immunitaires par les antigènes de l'hydatide tenant compte de la croissance silencieuse de l'hydatide pendant une longue période (**Larrieu et Frider, 2001**). À l'inverse, les kystes pulmonaires et en raison de la compression exercée sur le poumon provoquent un réflexe mécanique conduisant à l'évacuation du kyste (**Gottstein et Reichen, 2002; Blanton, 2007**). Nos résultats indiquent que la différence observée dans les profils de réponse immunitaire est étroitement liée à la localisation kystique suggérant que la production sérique du NO est dépendante de la localisation du kyste hydatique.

Il est à relever qu'au cours de l'infection pulmonaire, les interactions moléculaires entre les cellules inflammatoires et le métacestode ont été étudiées (**Muro et Pérez-Arellano, 2010**). Par ailleurs, il a été rapporté que les cellules épithéliales pulmonaires humaines et les macrophages alvéolaires constituent une source de production de NO. Dans ce cas, le NO est produit à la surface des cellules épithéliales, il agirait comme une barrière importante contre

les agents pathogènes au niveau du tractus respiratoire (**Liew et Cox, 1991; Taylor Robinson et al., 1994**).

La réduction de la production des nitrites chez les patients récidives est corrélée avec la diminution de la production de l'IFN- γ associée à la diminution des cellules CD4+ (**Touil-Boukoffa et al., 1998**).

Les patients présentant une double localisation ont montré une augmentation significative des nitrites. Cette observation indique une sollicitation accrue du système immunitaire en présence de kystes multiples. Cette dernière a également été rapportée par d'autres auteurs (**Refik et al., 2005**).

La présence des métabolites stables de NO dans les liquides hydatiques a été rapporté par notre équipe (**Ait Aissa et al., 2006, Zeghir-Bouteldja et al., 2013**). Ceci est probablement une conséquence de la charge antigénique via l'induction de l'IFN- γ . Les radicaux libres peuvent probablement diffuser à travers les couches kystiques (**Ait aissa et al., 2006**). Dans ce contexte, nous suggérons une possible implication des macrophages activés au niveau de l'adventice au cours de la réponse immunitaire innée locale. Ces cellules constituent une source importante de NO via la NOS2 et fortement activées par l'IFN- γ . Cette réponse locale pourrait probablement provoquer l'infertilité et l'involution du kyste hydatique (**Shepherd et al., 1991; Rigano et al., 1995, 2007; Vuitton 2003; Amri et al., 2007**). Toutefois, les cellules immunitaires logées au niveau de l'adventice sont incapables de pénétrer la couche germinative en raison de la présence de la barrière physique imposée par la couche laminaire. Ces données suggèrent une possible production locale *in situ* de NO, suggérant la présence d'une NOS endogène. Cependant de fortes concentrations de nitrites ont été détectées dans les liquides hydatiques fertiles comparées à celles détectées dans les liquides hydatiques non fertiles. Cette observation a également été rapportée par (**Amanvermez et Celik., 2002**) pour les liquides hydatiques de bovins.

Nous avons noté avec intérêt que les taux de nitrites dans les liquides hydatiques spléniques sont importants et ce, par rapport aux liquides hydatiques hépatiques et pulmonaires. Cette augmentation est probablement associée à la haute vascularisation de la rate.

À travers notre étude, les résultats relatifs au dosage des nitrites dans les liquides hydatiques selon la localisation kystique ont montré des taux élevés dans les liquides hydatiques issus de kystes localisés dans les tissus vascularisés et des taux faibles dans les sites anatomiques les moins vascularisés. Nous avons également observé que les kystes au niveau des organes vascularisés sont dans la majeure partie des cas uniloculaires et fertiles, au

niveau des tissus moins vascularisés (os, muscles, région paravertébrale), les kystes étaient multivésiculaires et infertiles (**Zeghir-Bouteldja et al., 2013**). Cette observation est à considérer.

Des similitudes dans la composition du liquide hydatique avec le sérum de l'hôte ont été rapportées néanmoins les concentrations en protéines sont plus faibles dans les liquides hydatiques comparées à celles du sérum suggérant que les protéines de l'hôte peuvent diffuser à travers les couches kystiques (**Goodchild et Kagan, 1961; Khorsandi et Tabibi, 1978, Chemale et al., 2003; Monteiro et al., 2010; Aziz et al., 2011; Virginio et al., 2012**). Nos résultats indiquent que le taux de protéines est associé à la localisation kystique ainsi que la vascularité de l'organe affecté. La présence des protéines dans les liquides hydatiques souligne la relation étroite entre le métacestode et son hôte intermédiaire. À l'inverse des taux de protéines mesurées dans les liquides hydatiques, les nitrites apparaissent dépendre de la fertilité du kyste hydatique.

Cette observation nous a amenés à investiguer de manière globale le protéome de trois liquides hydatiques différents issus de kystes de différentes localisations anatomiques: pulmonaire (fréquente), vertébrale et paravertébrale (localisations rares) et de différents niveaux de fertilité. Il était important de relever une différence dans l'expression des protéines. Nos observations sont en accord avec les travaux de rapportés par l'équipe de Latif (**Latif et al., 2013**). En effet, à mesure que progresse l'infection parasitaire, il s'établit une relation étroite entre le métacestode avec son hôte, induisant des répercussions sur le milieu environnant. Dans cette optique, l'analyse protéomique constitue une étude dynamique qui permettrait de montrer les répercussions physiopathologiques du kyste hydatique sur le tissu qui l'héberge.

En effet, la survie du macroparasite dans son environnement tissulaire reposerait sur la mise en place par celui-ci d'un système d'échanges avec les cellules de l'hôte. Dans ce sens, l'analyse protéomique a permis d'apporter un éclairage affirmatif quant à la présence de protéines de l'hôte et des protéines parasitaires sécrétées par les protosoles et la membrane germinative dans le liquide hydatique.

De manière intéressante, l'analyse protéomique a révélé l'identification de nouvelles protéines de l'hôte. Signalons qu'un grand nombre de protéines a été décrit dans d'autres travaux. Ainsi, l'identification de nouvelles protéines augmenterait le répertoire protéique des différents liquides hydatiques déjà rapporté par d'autres équipes (**Chemale et al., 2003; Monteiro et al., 2010; Aziz et al., 2011; Virginio et al., 2012**). Dans notre étude, l'alpha-1-antitrypsine, l'antithrombine III, la chitinase 3-like 1 et laprotéine'' heat shock 70 kDa protein

6” ont été identifiées pour la première fois dans le liquide hydatique humain. L’équipe de Xu **Xu et al., (1997)** a rapporté que les “heat shock proteins” (HSPs) jouent un rôle physiologique dans la protection contre le stress nitrosant. Dans notre contexte, l’identification de la HSP 90 dans les liquides hydatiques suggère un rôle régulateur de la NOS. Rappelons que cette protéine régule l’activité de la NOS3 (**Kupatt et al., 2004**). Il a été rapporté que la nitration de cette protéine induit l’apoptose (**Franco et al., 2013**).

Plus important, la chitinase 3-like 1, identifiée dans le LHV joue un rôle important dans l’inflammation, la réparation et le remodelage (**Areshkov et al., 2012; Hua He et al., 2013**). L’identification de cette protéine dans le liquide hydatique confirme l’instauration d’un échange entre le kyste hydatique et l’environnement vertébral soulignant une adaptation métabolique du métacestode en relation avec sa localisation. L’effet protecteur de cette protéine a été souligné dans plusieurs maladies parasitaires (**Choi et al., 2001; Nair et al., 2006; Sutherland et al., 2014**).

La production chronique du NO par les cellules de l’hôte plus particulièrement les cellules immunitaires au cours de l’infection parasitaire pourrait conduire à une altération structurale et fonctionnelle des tissus. L’identification des histones humaines pourrait indiquer une désintégration de la chromatine au niveau des cellules avoisinant le kyste hydatique. Toutefois, cette altération serait probablement associée à la production chronique du NO et de ses dérivés cytotoxiques tel que le peroxy-nitrite qui pourrait induire une apoptose (**Virag et al., 2003; Zeghir-Bouteldja et al., 2009**). Les travaux antérieurs rapportés par notre équipe (**AitAissa et al., 2006**) ont montré des altérations au niveau de la chromatine des hépatocytes de tissus hépatiques affectés par le kyste hydatique en relation avec l’expression *in situ* de la NOS2. Dans le même contexte, **Zahed en 2009** a observé la désintégration de la chromatine au niveau des hépatocytes avoisinant le kyste hydatique chez le mouton (**Zahed, 2009**).

Ainsi, l’exposition aux différents stimuli inflammatoires conduit à une production substantielle du NO conduisant aux modifications du microenvironnement cellulaire. Ces effets sont la conséquence de la formation du nitrogen trioxide et du peroxy-nitrite au site de la formation simultanée des anions superoxydes (**Chen et Deen, 2001**). Des travaux menés dans ce sens, ont montré des altérations au niveau des tissus ainsi que des lésions directes comme principales conséquences au cours de la Trichinellose (**Lawrence et al., 2000; Torrents et al., 2003**), la schistosomiase et la dirofilariose (**Kitoh et al., 2001**).

De plus, lors du développement du métacestode, l’environnement tissulaire est déstabilisé par la présence de la larve hydatique. À travers l’analyse protéomique des liquides hydatiques fertiles et non fertiles, nous avons tenté de rechercher l’impact de la production

chronique du NO vis-à-vis de la larve hydatique. De manière intéressante, cette analyse a permis d'identifier des protéines à activité antioxydante. La coexistence des protéines antioxydantes d'origine humaine et d'origine parasitaire souligne l'impact de l'environnement caractérisé par un stress oxydatif et nitrosant. Ces protéines agiraient par une action de détoxification. En effet, l'identification des protéines antioxydantes parasitaires constituerait un bon indicateur du processus de détoxification probablement du peroxy-nitrite généré par le NO produit. Dans ce sens, il a été rapporté que la peroxyrédoxine réduit le peroxy-nitrite (**Trujillo et al., 2008**). Plus récemment, Zheng a établi l'identification des enzymes antioxydantes dans le liquide hydatique du *Taenia hydatigena* soulignant un effet modulateur de la production du NO (**Zheng (2017)**). Par ailleurs, il a été rapporté que l'activité peroxyrédoxine était associée à la détoxification du peroxy-nitrite et ce dans le cas de microorganismes notamment *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis* et *Helicobacter pylori* (**Bryk et al., 2000**).

La survie des parasites est associée à leur système de défense contre les espèces oxygénées et nitrées produites par le système immunitaire de l'hôte. Cependant, il a été rapporté que les parasites expriment des enzymes antioxydantes tels que la glutathione S-transférase et la thioredoxine peroxydase (TPx) (**Li et al., 2004, Zheng, 2017**). Nous avons noté avec intérêt la présence de la 2-cys peroxyrédoxine et la thioredoxine peroxydase identifiées exclusivement dans le LHV. Signalons que le LHV était plus fertile que le LHP.

Ces protéines pourraient constituer une source intéressante de biomarqueurs utiles dans le suivi des patients hydatiques. En effet, la présence des protéines antioxydantes humaines et parasitaires nous oriente quant à l'instauration d'un déséquilibre de la balance du statut oxydant/antioxydant dans l'environnement kystique, résultant de la relation Hôte/*Echinococcus granulosus*. De manière intéressante l'analyse transcriptomique des produits de sécrétion des protoscolex a révélé l'expression d'un inhibiteur de la synthèse de l'oxyde nitrique neuronal (**Pan et al., 2014**).

Par ailleurs, le NO retrouvé dans les liquides hydatiques ne peut être lié uniquement à sa diffusion à travers les membranes kystiques mais aussi à l'existence probable d'une source supplémentaire endogène. Par ailleurs, la sérum albumine présente en quantité abondante dans le liquide hydatique constitue un système antioxydant car elle se lie aux anions superoxydes et au monoxyde d'azote. Cette dernière a également été identifiée au niveau des membranes kystiques et des protoscolex. Antérieurement, **Wegerhoff et Wenk, (1979)** ont rapporté que les microfilaires utérines étaient plus immunogènes que les microfilaires provenant du sang indiquant que certains parasites utiliseraient la sérum albumine de l'hôte pour masquer leurs

antigènes. Notons également que l'hémoglobine constitue une source du NO indépendamment du NO libéré par l'endothélium, l'hémoglobine constitue une source de NO au niveau vasculaire. Le NO se lie à l'hémoglobine pour former le nitrosylhémoglobine. L'hémoglobine se comporterait donc comme un scavenger du NO. Le mécanisme principal de ce phénomène est lié à la S-Nitrosylation de l'hémoglobine (SNO-Hb). Il a été rapporté que certains parasites modulerait la production des dérivés toxiques. Ainsi, l'hémoglobine protégerait les protozoaires intracellulaires contre l'effet antiparasitaire du NO (**Ascenzi et al., 2002; Stempin et Cerban, 2007**).

Les protéines parasitaires sont les produits de sécrétion/d'excrétion (PSE) des protoscolex et de la membrane germinative qui est très active sur le plan métabolique. Le NO fait probablement partie de ces molécules. **Amri, (2012)** a montré la production du NO par la membrane germinative. La recherche d'une NOS putative *in silico* a permis d'apporter des résultats préliminaires concernant la présence d'une NOS constitutive. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par Amri (**Amri, 2012**) quant à la présence d'une activité NOSlike au niveau du protoscolex. La NOS neuronale a été identifiée au niveau du tissu nerveux de *Schistosoma mansoni* (**Kohn et al., 2001**). Son activité a été détectée dans le tissu nerveux du némathode *Ascaris suum*, *Toxocara cani*. Elle a été également détectée dans le tissu musculaire de *Brugia malayi*, *Dirofilaria immitis* et *Acanthocheilonema vitae filariae* (**Pfarr et Fuhrman, 2000; Pfarr et al., 2001**)

La survie du macroparasite dans son environnement reposerait également sur la mise d'un système d'interaction avec le milieu environnant qui requiert l'intervention de plusieurs systèmes enzymatiques lui facilitant son extension et le protégeant des effecteurs du système immunitaire. Il a été récemment démontré que les PSE du protoscolex sont impliqués dans l'adaptation métabolique d'*E. granulosus* (**Pan et al., 2014**), L'électrophorèse sur SDS-PAGE a montré un nombre réduit de bandes protéiques au niveau du liquide hydatique infertile (LHPV) comparé aux liquides hydatiques fertiles (LHP et LHV). Ces observations sont en accord avec ceux rapportés par l'équipe de Latif (**Latif et al., 2013**). Nous avons noté avec intérêt la présence de la citrate synthase la seule protéine parasitaire identifiée dans le LHPV (le score enregistré par Mascot est de 62) qui est moins abondante par rapport au LHP (mascot score, 479) suggérant sa relation avec la fertilité. Toutefois, son absence dans LHV souligne l'impact de la localisation. L'analyse transcriptomique menée par Parkinson a révélé l'activité métabolique de la membrane germinative impliquant le cycle de Krebs (**Parkinson et al., 2012**). Certaines enzymes du métabolisme pourraient constituer une cible du NO dans un contexte thérapeutique.

L'analyse protéomique que nous avons réalisée a révélé une différence dans le profil d'expression des protéines parasitaires. Cette différence apparaît dépendre de la localisation kystique et de la fertilité des liquides hydatiques. Nos résultats sont en accord avec ceux rapportés par **Carmena et al., (2004); Monteiro et al., (2010)**. Nous avons noté avec intérêt la présence de la glucose phosphate isomérase putative dans le LHP, enzyme capable de stimuler la formation de nouveaux vaisseaux sanguins avoisinant le kyste hydatique favorisant sa croissance et son extension (**Pan et al., 2014**). Cette observation pourrait constituer un argument en faveur du rôle de la vascularisation des organes dans les échanges entre le parasite et son hôte intermédiaire. L'analyse transcriptomique réalisée par d'autres équipes et relative aux produits de sécrétion et d'excrétion du protoscolex conforte nos observations (**Pan et al., 2014**). L'analyse protéomique des liquides hydatiques a également montré une variation dans l'expression des antigènes en fonction de la localisation et de la fertilité des kystes hydatiques.

En effet, le liquide hydatique constitue une source majeure d'antigènes solubles et d'autres protéines à caractère "biomarqueurs" de l'hydatidose. En effet, le caractère multi antigénique du métacestode serait lié essentiellement à sa fertilité, aux produits de sécrétion des protoscolex et de la membrane germinative. Cette pluralité antigénique influencerait sur le niveau de production de NO (**Zeghir-Boutedja et al., 2013; Wang et al., 2015**). Nous ne devons pas occulter que l'antigénicité du matériel parasitaire pourrait également varier suivant l'hôte intermédiaire infecté et le degré d'activité du kyste ainsi que la souche infestante. De plus, les antigènes d'*E. granulosus* constitueraient des molécules immunomodulatrices. Ils contribuent à la persistance de l'infection en induisant la production de l'IL-4 (**Ortona et al., 2005**). L'AgB a été identifié exclusivement dans le LHP. Toutefois, la sous-unité 4 de l'AgB est exprimée à de fortes concentrations par les membranes kystiques (**Parkinson et al., 2012**).

Au cours de notre étude nous avons identifié plusieurs protéines HSPs dans les liquides fertiles. Elles ont été identifiées dans les produits de sécrétion et d'excrétion des protoscolex *in vitro* soumis à des températures élevées. Il a été rapporté que ces protéines agissent comme antigènes impliqués dans l'échappement immunitaire (**Del Giudice 1994; Martínez et al., 1999; Dobbin et al., 2002**). Des travaux basés sur l'analyse protéomique des protoscolex et des liquides hydatiques ont mis en évidence la présence de la HSP20 et la HSP70 (**Chemale et al., 2003**). D'autres antigènes ont été identifiés tels que: elongation factor-1 alpha (EF-1 alpha) et la cyclophiline (EA21) exclusivement dans le LHV. La protéine EF-1 alpha a été identifiée dans les produits d'excrétion et de sécrétion des protoscolex d' *E. granulosus* (la EA21 est un allergène capable d'induire la sécrétion des IgE **Ortona et al., 2001, 2002**;

Mezioug et al., 2009, 2012; Virginio et al., 2012). Il a été rapporté que ces antigènes sont probablement libérés dans le liquide hydatique après dégénérescence des protoscolex ou calcification (**Khabiri et al., 2006**). La présence d'une mosaïque antigénique au niveau du parasite stimulant une réponse mixte Th1 et Th2 pourrait expliquer la persistance de l'infection (**Mezioug et Touil-Boukoffa, 2009**). Ces antigènes pourraient jouer d'une façon directe ou indirecte dans régulation de l'expression de la NOS2. La protéine 14-3-3 identifiée dans les deux liquides hydatiques fertiles (LHP, LHV) a été également identifiée au niveau du métacestode d' *E. multilocularis* (**Andrade et al., 2004**). Cette dernière a été retrouvée chez le ver adulte d' *E. granulosus* (**Siles-Lucas et al., 2008**). Cette protéine est impliquée dans la réduction de la production du NO. Il a été rapporté que le parasite *Echinococcus granulosus* possède plusieurs gènes codant pour des molécules associées à l'immunité innée notamment les cytokines et le récepteur du tumor necrosis factor (TNF) pouvant interférer avec la réponse immunitaire de l'hôte et inhiber la réponse protectrice (**Pan et al., 2014**)

La couche laminaire constitue une interface entre le parasite et l'hôte. Il a été montré que la couche laminaire réduirait la production du NO qui constitue un effecteur de l'action antihydatique (**Amri et Touil-Boukoffa, 2015; Soufli et al., 2015; Khelifi et al., 2017**). Nous avons identifié l'annexine d'*E. granulosus* de la couche laminaire. L'identification de cette protéine a été rapportée au niveau des membranes kystiques d'origine bovine (**Diaz et al., 2000**). Il a été rapporté que l'annexine inhibe l'expression de l'ARNm de la NOS2 d'où réduction de la production du NO (**Ferlazzo et al., 2003, Smythet al., 2006**). La présence de cette protéine à l'interface parasitaire suggère un rôle dans l'immunorégulation de la voie de la NOS2. Cette action pourrait s'exercer dans un contexte de protection du macroparasite vis-à-vis des effets du NO. Bien que nous ayons mis en évidence la présence de protéines dont l'expression est tributaire de plusieurs facteurs (la localisation anatomique, la fertilité). Il reste à éclaircir les mécanismes régissant leur pénétration. Il est grandement nécessaire de poursuivre les recherches sur le contrôle de la perméabilité de la membrane du kyste hydatique et le passage à travers celle-ci pour mieux comprendre les problèmes de la nutrition et de la croissance du kyste ainsi que l'action de la chimiothérapie.

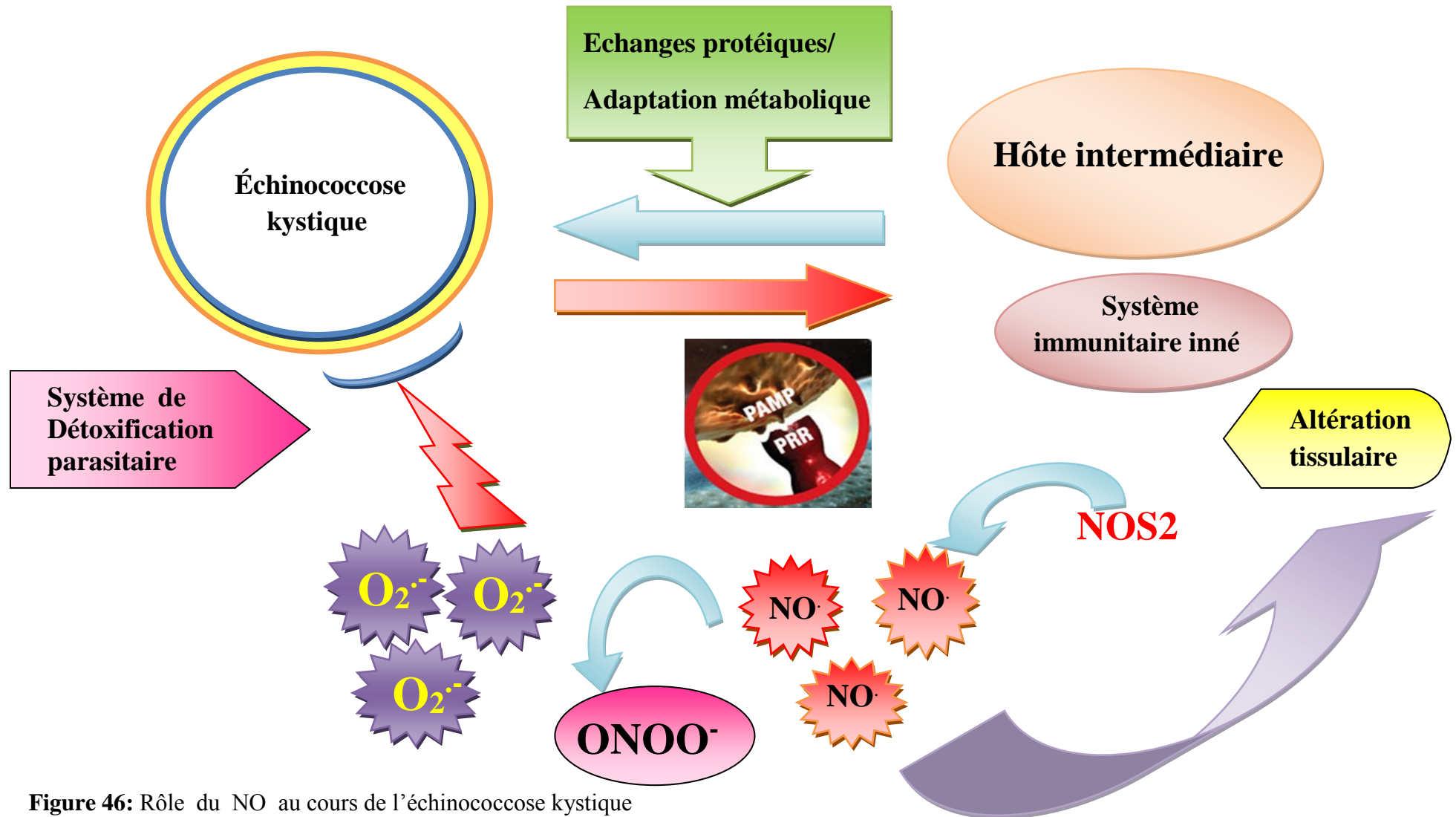


Figure 46: Rôle du NO au cours de l'échinococcose kystique

CONCLUSION GÉNÉRALE

Conclusion

L'étude que nous avons menée, a indiqué que les effets du NO sont tributaires des différentes localisations kystiques de l'hydatidose et impliquent plusieurs facteurs, la variabilité antigénique, l'hétérogénéité bio-moléculaire de la larve hydatique, la viabilité des kystes ainsi que leur fertilité.

Les protéines excrétées par la larve hydatique semblent jouer un rôle crucial dans la protection du macroparasite contre les effets du NO en faveur de sa persistance mettant en jeu une dualité fonctionnelle exercée par le NO selon la source des NOS, l'hôte ou le parasite (effet délétère ou protecteur).

Dans son ensemble, l'analyse protéomique du liquide hydatique que nous avons réalisée et celle relative aux protoscolex a un impact certain sur l'élucidation des mécanismes de survie mis en jeu par le parasite.

La caractérisation de nouvelles protéines hydatiques impliquées à la fois dans la physiologie du parasite et des dommages induits chez l'hôte constitue des perspectives prometteuses dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, de pronostic et de diagnostic.

Perspectives

L'analyse protéomique globale des liquides hydatiques que nous avons réalisée a donc ouvert de nouvelles perspectives, il serait intéressant de développer les points suivants:

- Recherche de marqueurs de viabilité nécessaire au suivi thérapeutique.
- Réalisation de la DIGE pour l'étude des protéines exprimées par *E. granulosus*.
- Recherche des protéines cibles du NO et de ses dérivés.
- Étude du rôle des protéines de l'hôte intermédiaire dans les liquides hydatiques.
- Recherche du rôle de la NOS au niveau d'*E. granulosus*.
- Étude du rôle des protéines sécrétées dans l'immunorégulation de l'expression de la NOS2.

RÉFÉRENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abo-Shousha, S., Khalil, S. S., and Rashwan, E. A. (1999). "Oxygen free radical and nitric oxide production in single or combined human schistosomiasis and fascioliasis," *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 29(1), 149–156.
2. Abu-Soud, H.M., Stuehr, D.J. (1993). Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci*. 90, 10769–10772.
3. Aceti, A., Pennica, A., Teggi, A. et al. (1993). IgG subclasses in human hydatid disease: prominence of the IgG4 response. *Int Arch Allergy Immunol*. 102, 347–51.
4. Adak S., Ghosh S., Abu-Soud H. M. and Stuehr D. J. (1999). Role of Reductase Domain Cluster 1 Acidic Residues in Neuronal Nitric-oxide Synthase. *The journal of biological chemistry*. 274 (32), 22313–22320.
5. Aebersold, R., Mann, M. (2003). Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422, 198-207.
6. Ait Aissa, S., Amri, M., Bouteldja, R., Wietzerbin, J., Touil-Boukoffa, C. (2006). Alterations in interferon-gamma and nitric oxide levels in human echinococcosis. *Cell Mol Biol*. 52, 65–70.
7. Akaike, T. et Maeda, H. (2000). Nitric oxide and virus infection. *Immunology*. 101, 300-308.
8. Alessandra Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A. and Ortona, E. (2012). Cystic Echinococcosis: Aspects of Immune Response, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Human Host *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*. 12, 16-23.
9. Ali, A.A., Coulter, J.A., Ogle, C.H., Migaud, M.M., Hirst, D.G., Robson, T. and McCarthy, H.O. (2013). The contribution of N₂O₃ to the cytotoxicity of the nitric oxide donor DETA/NO: an emerging role for S-nitrosylation. *Biosci. Rep.* 33(2), art:e00031.doi:10.1042/BSR20120120.
10. Alyaman, F. et Knobloch, J.(1989).Isolation and partial characterisation of species specific and cross reactive antigens of *Echinococcus granulosus* cyst fluid. *Mol.Bioche.Parasitol*.37,101-107.
11. Amanvermez, R., Celik, C. (2002). Effectiveness of free radicals in hydatid cysts. *J Egypt Soc Parasitol*. 32, 259–269.
12. Amri, M., Mezioug, D., Ait Aissa, S., Touil-Boukoffa C. (2005). Purification de deux antigènes de l'échinococcose humaine par gel filtration et chromatographie d'affinité: impact sur la production de l'IL-8, l'IL-12 et le NO. *J. Soc.Alger.Chim*. 15(12),187-184.
13. Amri, M., Ait Aissa, S., Belguendouz, H., Mezioug, D., Touil-Boukoffa, C. (2007). *In vitro* antihydatic action of IFN- γ is dependent on the nitric oxide pathway. *J Interferon Cyt Res*. 27, 781–787.
14. Amri, M., Mezioug, D.,Touil-Boukoffa C. (2009). Involvement of IL-10 and IL-4 in evasion strategies of *Echinococcus granulosus* to host immune response. *Eur Cytokine Netw*.20(2), 63-8. doi: 10.1684/ecn.2009.0154.
15. Amri, M. (2012).Etude du role des effecteurs cytokiniques, antigéniques, et du monoxyde d'azote dans le rapport de l'immunité /échappement parasitaire au cours de l'échinococcos. Thèse de doctorat Biochimie-immunologie, FSB-USTHB.

16. Amri, M., Touil-Boukoffa, C. (2015). protective effect of the laminated layer on *Echinococcus granulosus* survival dependent on upregulation of host arginase. *Acta Trop.* 149, 186-94.
17. Andrade, M.A., Siles-Lucas, M., Espinoza, E., Pérez-Arellano, J. L., Gottstein, B., Muro, A. (2004). *Echinococcus multilocularis* laminated-layer components and the E14t 14-3-3 recombinant protein decrease NO production by activated rat macrophages *in vitro*. *Nitric Oxide.* 10, 150-155.
18. Areshkov, P.O., Avdieiev, S.S., Balynska, O.V., Leroith D., and Kavsan, V.M., (2012). Two closely related human members of chitinase-like family, CHI3L1 and CHI3L2, activate ERK1/2 in 293 and U373 cells but have the different influence on cell proliferation. *Int. Biol. Sci.*, 8, 39-48.
19. Ascenzi, P., Fasano, M., Gradoni, L. (2002). Do hemoglobin and hemocyanin impair schistosoma killing by no? *IUBMB Life.* 53(6), 287-8.
20. Aziz, A., Zhang, W., Lib, J., Loukasa, A., McManus, D.P., Mulvenna, Ja. (2011). Proteomic characterisation of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid from sheep, cattle and humans. *Journal of Proteomic.* 74,1560.
21. Balligand, J.L., Feron, O., Dessy, C. (2009). Enos activation by physical forces: From short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev.* 89, 481-534.
22. Barnes, T.S., Hinds, L.A., Jenkins, D.J., Coleman, G.T. (2007). Precocious development of hydatid cysts in a macropodid host. *Int J Parasitol.* 37(12), 1379-89.
23. Bascal, Z. A., Montgomery, A., Holden-Dye, L., Williams, R. G., Walker, R. J. (1995). "Histochemical mapping of NADPH diaphorase in the nervous system of the parasitic nematode *Ascaris suum*," *Parasitology.* 110 (5), 625–637.
24. Bascal, Z. A., Cunningham, J. M., Holden-Dye, L., O'Shea, M., and Walker, R. J., (2001). "Characterization of a putative nitric oxide synthase in the neuromuscular system of the parasitic nematode, *Ascaris suum*," *Parasitology.* 122, (2) 219 – 231.
25. Baudin, B. (2015). Spectrométrie de masse et protéomique clinique. *Ann Biol Clin.* 73 (1), 39-48.
26. Baudin, B., Bruneel A. (2004). L'analyse protéomique : intérêts et perspectives en biologie clinique Immuno-analyse t biologie spécialisée. 19 (6), 313-322.
27. Baz, A., Carol, H., Marco, M., Casabo, L., Jones, F., Dunne, D., Nieto, A., (1998). Fc- binding molucles specific for IgG1 and IgG3 are present in *Echinococcus granulosus* protoscolec. *Parasite immunology.* 20, 399.
28. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.(1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxyxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87,620-4.
29. Belguendouz H., Messaoudène D., Lahmar K., Ahmedi L., Medjeber O., Hartani D., Lahlou-Boukoffa O., Touil-Boukoffa C. (2011) Interferon- γ and Nitric Oxide Production During Behçet Uveitis: Immunomodulatory Effect of Interleukin-10. *J Interferon Cytokine Res.* 31(9), 643-51.
30. Belkhef-Slimani, R., Djerdjouri, B. (2017). Caffeic acid and quercetin exert caspases-independent apoptotic effects on *Leishmania major* promastigotes, and reactivate the

- death of infected phagocytes derived from BALB/c mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Asian. Pac. J. Trop. Biomed.7(4), 321–331.
31. Bell, R.G. (1996). IgE, allergies and helminth parasites: a new perspective on an old conundrum. *Immunol Cell Biol.* 74, 337–345.
 32. Bender, A.T., Silverstein, A.M., Demady, D.R., Kanelakis, K.C., Noguchi, S., Pratt, W.B., Osawa, Y. (1999). Neuronal nitric-oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J Biol Chem.* 274, 1472–1478.
 33. Bezzari, M., Bigaignon, G., Nacherga J., Laasou K., Gigot J.F. et Ayadil A. (1999). l'hydatidose: Echinococcose d'importance en Belgique. *Louvain Med.* 118, 64-71.
 34. Blanton, R. (2007). Echinococcosis. In: Behrman RE, Kliegmann RM, Jenson HB (eds) *Nelson textbook of pediatrics*, 18th edn. Saunders, Philadelphia. 1516–1518.
 35. Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000). Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr Opin Immunol* . 12, 64-76.
 36. Boggs, S., Huang, L., & Stuehr, D. J. (2000). Formation and reactions of the heme- dioxygen intermediate in the first and second steps of nitric oxide synthesis as studied by stopped-flow spectroscopy under single-turnover conditions. *Biochemistry.* 39(9), 2332–2339.
 37. Bortoletti, G. and Ferretti, G. (1978). Ultrastructural aspects of fertile and sterile cysts of *Echinococcus granulosus* developed in hosts of different species. *Int. J. Parasitol.* 8, 421–431.
 38. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of the microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248–254.
 39. Bredt, D. S., Hwang, P. M., & Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347(6295), 768.
 40. Bredt, D.S, Snyder, S.H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci.* 87, 682-685.
 41. Brunetti, E. et al. (2010). Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. *Acta Trop.* 114, 1-16.
 42. Bryk R, Griffin P, Nathan C. (2000). Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins. *Nature.* 14, 407(6801), 211-5.
 43. Budke, C.M., White, A.C. Jr. and Garcia, H.H. (2009). Zoonotic larval cestode infections: neglected, neglected tropical diseases? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e319.
 44. Burdon, M.G., Butler, A.R., Renton, L.M. (1996). A study of antibacterial activity of nitric oxide donor compounds. In :*The biology of nitric oxide*, ed. by Moncada S, Stamler J, Gross S, Higgs EA. Portland Press Ltd., London. p.170.
 45. Carmena, D., Martínez, J., Benito, A., Guisantes, J.A. (2004). Characterization of excretory–secretory products from protoscoleces of *Echinococcus granulosus* and evaluation of their potential for immunodiagnosis of human cystic echinococcosis. *Parasitology.* 129, 371–8.
 46. Carmena, D., S´anchez-Serrano, L. P., and Barbero-Mart´inez, I. (2008). “*Echinococcus granulosus* infection

- in Spain,” *Zoonoses and Public Health*. 55(3), 156–165.
47. Casaravilla, C. et al. (2006). Characterization of myo-inositol hexakisphosphate deposits from larval *Echinococcus granulosus*. *FEBS J.* 273, 3192–3203.
48. Chemale, G., van Rossum, A.J., Jefferies, J.R., Barrett, J., Brophy, P.M., Ferreira, H.B., Zaha, A. (2003). Proteomic analysis of the larval stage of the parasite *Echinococcus granulosus*: causative agent of cystic hydatid disease. *Proteomics*. 3, 1633–6.
49. Clark, I.A., al-Yaman, F.M., Cowden, W.B., Rockett, K.A. (1996). Does malarial tolerance, through nitric oxide, explain the low incidence of autoimmune disease in tropical Africa? *Lancet*. 348, 1492–494.
50. Craig, P.S., Larrieu, E. (2006). "Control of cystic echinococcosis/hydatidosis: 1863–2002.
51. Craig, P.S. (2006). Epidemiology of human alveolar echinococcosis in China. *Parasitol Int.* 55, 221–5.
52. Cui, S.J., Xu, L.L., Zhang, T., Xu, M., Yao, J., Fang, C.Y., Feng, Z., Yang, P.Y., Liu, F. (2013). Proteomic characterization of larval and adult developmental stages in *Echinococcus granulosus* reveals novel insight into host-parasite interactions. *J Proteomics*. 84, 158–75.
53. Daeki, A. O., P. S. Craig, and Shambesh. M. K. (2000). IgG-subclass antibody responses and the natural history of hepatic cystic echinococcosis in asymptomatic patients. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 94, 319–328.
54. Diaz, A., Casaravilla, C., Irigon, F., Lin, G., Previato, J.O., Ferreira, F. (2011). Understanding the laminated layer of larval *Echinococcus*: structure. *Trends Parasitol.* 27, 204–13.
55. Drapier, J.C., Payen, D., Verrecchia, C. (1996) Monoxyde d'azote un gaz à facettes. *Biofutur*. 153, 25–30.
56. Drapier, J.C. (1997) Monoxyde d'azote et macrophages. *Path.Bio.* 45(2), 110–114.
57. Dreyer, J., Schleicher, M., Tappe, A., Schilling, K., Kuner, T., Kusumawidijaja, G., Müller-Esterl, W., Oess, S. and Kuner R. (2004) Nitric Oxide Synthase (NOS)-Interacting Protein Interacts with Neuronal NOS and Regulates Its Distribution and Activity *The Journal of Neuroscience*. 24(46), 10454 – 10465.
58. Dugas, B., M., Mossalayi, D., Damais, C., Kolb, J.P. (1995). Nitric oxide production by human monocytes: evidence for a role of CD23. *16 (12)*, 574–580.
59. Dzik, J.M. (2006). Molecules released by helminth parasites involved in host colonization. *Acta Biochim Pol.* 53(1), 33–64.
60. Eckert, J., Kutzer E., Rommel, M., Bürger, H.J. & Körting, W. (1992). *Veterinärmedizinische Parasitologie*, 4. Auflage, Verlag Paul Parey, Berlin, 905 pp.
61. Eckert, J., Gemmel, M.A., Meslin, F.X., Pawlowski, Z.S. (2001). (eds), WHO/OIE Manuel on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. OIE/WHO. Paris, p: 20–71.
62. EJ Golzari S. and Mohsen Sokouti M. (2014). Pericyst: The outermost layer of hydatid cyst. *World J. Gastroenterol.* 20(5), 1377–1378.
63. Esmaelizad, M., Ahmadian, G, Aghaiypour, K, Shamsara, M., Habibellah Paykari, H., Tebianian, M. (2013). Induction of protective T-

- helper 1 immune responses against *Echinococcus granulosus* in mice by a multi-T-cell epitope antigen based on five proteins. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 108(4), 408-413.
64. Euzeby, J. (1971) Les échinococcoses animales et leurs relations avec les échinococcoses de l'homme. Paris : Vigot Frères, 163p.
65. Fan, C. K., Lin, Y. H., Hung, C. C., Chang S. F., and Su K. E. (2004), "Enhanced inducible nitric oxide synthase expression and nitrotyrosine accumulation in experimental granulomatous hepatitis caused by *Toxocara canis* in mice," *Parasite Immunology.* 26, 273 –281.
66. Forstermann, U., and Sessa, W.D. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function *European Heart Journal.* 33, 829–837.
67. Freire, T., Fern`andez, C., Chalar, C., Maizels, RM., AlzariI, P., Osinaga, E.,and Carlos, R. (2004).Characterization of a UDP- N-acetyl-D-galactosamine:polypeptide N-acetyl galactosaminyltransferase with an unusual lectin domain from the platyhelminth parasite *Echinococcus granulosus*. *Biochem. J.* 382, 501–510.
68. Frider, B., Larrieu, E., Odriozola, M. (1999). Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. *J. Hepatol.* 30, 228–231.
69. Fulton, D., Gratton J. P., McCabe T. J., Fontana J., Fujio Y., Walsh K., Franke T. F.,Papapetropoulos A. and Sessa W. C. (1999) Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, 399(6736), 597-601.
70. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288, 373-376.
71. Galindo, M., Gonzales, M.J., and Galanti, N. (2002). *Echinococcus granulosus* protoscolex in natural infections. *Biol. Res.* 35, 365-376.
72. Galindo, M., Schadebrodt, G., Galanti, N. (2008). *Echinococcus granulosus*: cellular territories and morphological regions in mature protoscoleces. *Exp Parasitol.* 119, 524–33.
73. Garcia-Cardena, G., Fan, R., Shah, V., Sorrentino, R., Cirino, G., Papapetropoulos A., and Sessa, W.C. (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.*392, 821–824.
74. Garraud, O., Perraut, R., Riveau, G., Nutman, T.B. (2003) Class and subclass selection in parasite-specific antibody responses. *Trends Parasitol.* 19, 300–4.
75. Ghafourifar, P.,Cadenas, E., (2007).Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.*26(4), 190-5.
76. Gharbi, H.A., Hassine, W., Brauner, M.W., Dupuch, K., (1981). Ultrasound examination of the hydatid liver. *Radiology.* 139, 459–463.
77. Guo, F.H., Uetani, K., Haque, S.J., Williams, B.R., Dweik, R.A., Thunnissen, F.B., Calhoun, W., Erzurum, S.C. (1997) Interferon gamma and interleukin 4 stimulate prolonged expression of inducible nitric oxide synthase in human airway epithelium through synthesis of soluble mediators. *J Clin Invest.* 100, 829-838.
78. Halliwell, B., Zhao, K. and Whiteman M. (1999) Nitric oxide and peroxynitrite. The ugly , the uglier and the not so good: a personal view of recent controversies. *Free Radic. Res.* 31(6), 651-669.
79. Hamrioui, B. (1986). Etude des composants du liquide hydatique :

- leur apport hydatidologique. Thèse de Doctoaat en sciences médicales. Alger.
80. Hamrioui, B. et al. (1988).Caractère physicochimique de la fraction5 du liquide hydatique. Arch.Inst.Paste.Alg. 56,129-154.
81. Haniloo, A., Ghasemi, F., Shikhi, A.K., Ghavami, M.B. (2008). Immunoregulatory cytokine (TGF- β And IL-10) responses in mice inoculated with protoscolecocytes and major hydatid fluid antigens of cystic echinococcosis. *Iranian J. Parasitol.*3,18-23.
82. Hemmens, B., & Mayer, B. (1998). Enzymology of nitric oxide synthases. *Nitric oxide protocols.* 1–32.
83. Hewitson, J.P., Grainger, J.R., Maizels, R.M. (Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol.*167, 1–11.
84. Hochstrasser, D.F. (1997). In: Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (eds) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Springer, Heidelberg. 211.
85. Holscher, C. (1997). Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.*20(7), 298-303.
86. Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Profumo, E., Franchi, C., Ortona, E., Riganò, R., Siracusano, A. (1996) Immunological responses to antigen B from *Echinococcus granulosus* cyst fluid in hydatid patients. *Parasite Immunol.* 18, 571–8.
87. Irigoien, F. et al. (2004). Unique precipitation and exocytosis of a calcium salt of myo-inositol hexakisphosphate in larval *Echinococcus granulosus*. *J. Cell. Biochem.* 93, 1272–1281.
88. Ito, A., Craig, P.S. (2003). Immunodiagnostic and molecular approaches for the detection of taeniid cestode infections. *Trends Parasitol.* 19, 377–381.
89. Ito, A., Wandra, T., Sato, M.O., Mamuti, W., Xiao, N., Sako, Y., Nakao, M., Yamasaki, H., Nakaya, K., Okamoto, M., Craig, P.S. (2006).Towards the international collaboration for detection, surveillance and control of taeniasis/ cysticercosis and echinococcosis in Asia and the Pacific. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 37 Suppl 3, 82-90.
90. James S. L, (1995). Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol Rev.* 59(4), 533–547.
91. Junghanss, T., da Silva, A.M., Horton, J., Chiodini, P.L., Brunetti, E. (2008). Clinical management of cystic echinococcosis: state of the art, problems, and perspectives.*Am J Trop Med Hyg.*79(3), 301-11.
92. Kanazawa, T., Asahi, H., Hata, H., Mochida, K., Kagei, N., Stadecker M.J. (1993) Arginine-dependent generation of reactive nitrogen intermediates is instrumental in the *in vitro* killing of protoscolecocytes of *Echinococcus multilocularis* by activated macrophages. *Parasite Immunol.* 15(11), 619-23.
93. Karaman, U., Kiran, T.R., Colak, C., Iraz, M., Celik, T., Karabulut, A.B. (2009) Serum malondialdehyde, glutathione and nitric oxide levels in patients infected with *Entamoeba coli*. *Int J Med Medical Sci.* 1, 235–237.
94. Kellner, R.(2000). Proteomics. Concepts and perspectives. *Fresenius J Anal Chem.* 366, 517–524.
95. Keshmiri, M., Baharvahdat, H., Fattahi, S.H., Davachi, B., Dabiri, R.H., Baradaran, H., Rajabzadeh, F.(2001). Albendazole versus placebo

- in treatment of echinococcosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 95(2), 190-4.
96. Khabiri, A.R., Bagheri, F., Assmar, M., Siavashi, M.R. (2006). Analysis of specific IgE and IgG subclasses antibodies for diagnosis of *Echinococcus granulosus*. *Parasite Immunol.* 28(8), 357-62.
97. Khelifi, L., Soufli, I., Labsi, M., Touil-Boukoffa, C. (2017). Immune-protective effect of echinococcosis on colitis experimental model is dependent of down regulation of TNF- α and NO production. *Acta Trop.* 166,7-15. doi : 10.1016/j.actatropica.2016.10.020.
98. Khuroo, M.S. (2002). Hydatid disease : current status and recent advance. *Annals of Sauda medecine.* 22, 56-64.
99. Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H.P., Mayer, B. (1995). Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and l-arginine in the formation of an sdsresistant dimer. *EMBO J.* 14, 3687-3695.
100. Knowles, R.G. and Moncada, S.(1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 298, 249-258.
101. Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S., & Stamler, J. S. (1994). Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature*, 372(6506), 546.
102. Kohn, B., Moroz, L.L., Lea, J. M., and Greenberg, R. M. (2001) "Distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the nervous system and peripheral tissues of *Schistosoma mansoni*," *Parasitology*, 122(1), 87–92.
103. Kolb, J.P., Paul-Eugène Dugas,N.,Yamaoka, K., Mossalayi, M.D., Dugas, B.(1995). Role of CD23 in NO production bu human monocytic cells. *Research in immunology.*584-589.
104. Koppenol, W. H., Kissner, R. and Beckman, J. S. (1996). Syntheses of peroxynitrite: to go with the flow or on solid grounds?. *Methods Enzymol.* 269, 296–302.
105. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227, 680-5.
106. Lanone, S., Manivet, P., Callebert, J., Launay, JM., Payen, D., Aubier, M., Boczkowski, J., Mebazaa, A. (2002).Inducible nitric oxide synthase (nos2) expressed in septic patients is nitrated on selected tyrosine residues: Implications for enzymic activity. *Biochem J* . 366,399-404.
107. Larrieu, E.J, Frider, B. (2001). Human cystic echinococcosis: contributions to the natural history of the disease. *Ann Trop Med Parasitol*, 95, 679–687.
108. Lewall, D.B., (1998). Hydatid disease: Biology, pathology, imaging and classification. *Clinical radiology.* 53(12), 863–874.
109. Li, FR., Shi, Y.E., Shi, D.Z., Vuitton, D.A., Craig, P.S. (2003). Kinetic analysis of cytokines and immunoglobulin G subclass in BALB/c mice infected with *Echinococcus alveolaris*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi.* 21(6), 357-60.
110. Li, Y.J., Wang, J., Zhao, H., Jia, H.Y., Li, B., Ma, X.M., Wen, H. and Ding, J.B. (2011). Bioinformatics prediction on Eg95 antigen epitopes of *Echinococcus granulosus*. *Chin J Zoonoses.* 27, 892-895.
111. Lightowlers, M. W., Liu, D., Haralambous, A., and Rickard, M. D. (1989). Subunit composition and specificity of the major cyst fluid

- antigens of *Echinococcus granulosus*," *Molecular and Biochemical Parasitology*. 37(2), 171-182.
112. Lightowers M.W., Gill H.S. & Le Jambre L.F. (1996). Vaccination against cestode parasites. *Int. J. Parasitol.* 26,819-824.
113. Lorenzo,C., Salinas, G , Brugnini, A., C. Wernstedt, C., Hellman, U. and G. Gonz'alez-Sapienza, G. (2003). "Echinococcus granulosus antigen 5 is closely related to proteases of the trypsin family," *Biochemical Journal*. 369 (1), 191-198.
114. Lowenstein C.J., Alley, E.W., Raval, P., Snowman, A.M., Snyder, S.H., Russell, S.W., Murphy, W.J. (1993). Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by interferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci*. 15, 90(20), 9730-4.
115. Lymbery, A.J., Jenkins, E.J., Schurer, J.M., Thompson, R.C. (2014). *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends Parasitol.* doi:10.1016/j.pt.2014.11.003.
116. MacMicking, J., Xie, Q.W., Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 15, 323-50.
117. Macpherson, C.N., Milner, R. (2003). Performance characteristics and quality control of community based ultrasound surveys for cystic and alveolar echinococcosis. *Acta Trop*. 85, 203-209.
118. Maizels, R.M., Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 3, 733-44.
119. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J. and Sessa W. C. (2000). Enhanced electron flux *Medicine And Hygiene*. 97, 203-211.
120. Michel, T., Feron, O. (1997) Nitric oxide synthases: which, where, how, and why ? *J Clin Invest*. 100, 2146-52.
121. Mungrue I. N. and Bredt D. S. (2004) nNOS at a glance: implications for brain and brawn. *J. Cell Sci*. 117(13), 2627-2629.
122. Margutti, P., Ortona, E., Vaccari, S. et al., (1999). "Cloning and expression of a cDNA encoding an elongation factor 1 β / δ protein from *Echinococcus granulosus* with immunogenic activity," *Parasite Immunology*, 21(9), 485-492.
123. Mayer, B. (1998). Structure and function of nitric oxide synthase. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*. 2, 390-91.
124. Meerkhan, A.A. (2013). Biochemical Study of Germinal and Laminated Layers of Hydatid Cyst of *Echinococcus granulosus* and Surrounding Host Tissues Isolated from Different Intermediate Hosts. *International Journal of Chemical, Environmental & Biological Sciences (IJCEBS)*. 1(4), 585-588.
125. Mellouk, S., Green, S.J., Nacy, C.A, Hoffman, S.L. (1991). IFN-gamma inhibits development of *Plasmodium berghei* exoerythrocytic stages in hepatocytes by an L-arginine-dependent effector mechanism. *J Immunol*. 146,3971-976.
126. Menezes da Silva, A. (2010). In: *Gastroenterology Research and Practice*; Senturk, H., Ed.; Hindawi Publishing Corporation: Cairo. 1-9.
127. Mezioug, D. (2002). Etude de la production in vivo et in vitro des cytokines marqueurs de la voie Th1 et Th2 au cours d l'hydatodose humaine.

- Thèse de Magister. Iochimie-immunologie. FS-USTHB. Editions médicales internationales Lavoisier, 415-422.
128. Mezioug, D. and Touil-Boukoffa, C. (2009). *Cytokine profile in human hydatidosis possible role in the immunosurveillance of patients infected with Echinococcus granulosus*. Parasite. 16(1), 57-64.
129. Mezioug, D., Touil-Boukoffa C. (2012). *Interleukin 17A correlates with interleukin 6 production in human cystic echinococcosis a possible involvement of IL 17A in immunoprotection against Echinococcus granulosus infection*. Eur. Cytokine Netw. 23(3), 112-9.
130. Moncada, S., Higgs, E.A. (1991). Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. Eur J Clin Invest. 21, 361–374.
131. Moncada, S. and Higgs, E. A. (1995) Molecular Mechanisms a Strategies Related to Nitric-Oxide. *Faseb J.* 9(13), 1319-1330.
132. Moncada, S., Higgs, A., & Furchgott, R. (1997). XIV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research. *Pharmacological reviews.* 49(2), 137–142.
133. Monteiro, K.M., Marcos, O., de Carvalho Zaha, A., Ferreira, H.B. (2010). Proteomic analysis of *the Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics.* 10, 1985-1999.
134. Motard, A., Landau, I., Nussler, A., Grau, G., Baccam, D., Mazier, D., Targett, G.A. (1993) The role of reactive nitrogen intermediates in modulation of gametocyte infectivity of rodent malaria parasites. *Parasite Immunol.* 15, 21-26.
135. Moulinier, C. (2003). Eléments et morphologie de la biologie.
136. Mufit, K., Nejat, I., Mercan, S., Ibrahim, K., Mete, U.Y., Yuksel, K. (1998). Growth of multiple hydatid cysts evaluated by computed tomography. *J. Clin. Neurosci.* 5, 215–217.
137. Murad, F. (1986). Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest.* 78, 1-5.
138. Muro, A., and P´erez-Arellano J.L. (2010), Nitric Oxide and Respiratory Helminthic Diseases Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology, Article ID 958108, 8 pages doi:10.1155/2010/958108.
139. Nair, M.G., Guild, K.J., Artis, D. (2006). Novel Effector Molecules in Type 2 Inflammation: Lessons Drawn from Helminth Infection and Allergy. *J Immunol.* 177, 1393-1399.
140. Nakao, M., Lavikainen, A., Yanagida, T., Ito, A. (2013a). Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *Int. J. Parasitol.* 43, 1017–1029.
141. Nakao, M., Yanagida, T., Konyaev, S., Lavikainen, A., Odnokurtsev, V.A., Zaikov, V.A., Ito, A. (2013b). Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology.* 140, 1625–1636.
142. Niles, J.C, Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (2006). Peroxynitrite-induced oxidation and nitration products of guanine and 8-oxoguanine: structures and mechanisms of product formation. *Nitric Oxide.* 14, 109–121.
143. Nussler, A.K., Di Silvio M., Billiar, T.R., Hoffman, R.A., Geller,

- D.A., Selby, R., Madariaga, J. & Simmons R.L. (1992) Stimulation of the nitric oxide synthase pathway in human hepatocytes by cytokines and endotoxin. *Journal of Experimental Medicine*. 176, 261-264.
144. Oetl, K., Marsche, G. (2010). Redox state of human serum albumin in terms of of cysteine-34 in health and disease. *Methods Enzymol*. 474, 181-95.
145. OMS, 27th World Congress of echinococcosis (2017). Actions de l'Organisation Mondiale de la santé. *Santé Mag* . 65, 22-28.
146. O'Farrel, P.H, (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.*, 250, 4007-4021.
147. Ortona, E., Margutti, P., Vaccari, S., Rigano, Á.R, Profumo, E., Buttari, B., Chersi, A., Teggi, A., Siracusano, A. (2001). Elongation factor 1 b/d of *Echinococcus granulosus* and allergic manifestations in human cystic echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol*. 125, 110-116.
148. Ortona, E., Vaccari, S., Margutti, P., Delunardo, F., Rigano, R., Profumo, E., Buttari, B., Rasool, O., Teggi, A., Siracusano, A. (2002). Immunological characterization of *Echinococcus granulosus* cyclophilin, an allergen reactive with IgE and IgG4 from patients with cystic echinococcosis. *Clin. Exp. Immunol*. 128(1), 124-30.
149. Ortona, E. Margutti, P., Delunardo F. et al., (2003). Molecular and immunological characterization of the C-terminal region of a new *Echinococcus granulosus* Heat Shock Protein 70. *Parasite Immunology*. 25(3), 119–126.
150. Ortona, E., Margutti, P., Delunardo, F. et al. (2005). "Screening of an *Echinococcus granulosus* cDNA library with IgG4 from patients with cystic echinococcosis identifies a new tegumental protein involved in the immune escape. *Clinical and Experimental Immunology*. 142 (3), 528–538.
151. Pacher, P., Beckman, J.S., Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews* Published. 87, (1), 315-424.
152. Pan, W., Shen, Y., Han, X., Wang, Y., Liu, H., Jiang, Y., et al. (2014). Transcriptome profiles of the protoscoleces of *Echinococcus granulosus* reveal that excretory-secretory products are essential to metabolic adaptation. *PLoS Negl Trop Dis*. 8 doi: 10.1371/journal.pntd.0003392.
153. Pan, W., Chen, D.S., Lu, Y.J., Xu, H.W., Hao, W.T., Zhang, Y.W., Qin, S.P., Zheng, K.Y., Tang, R.X. (2017). Genetic diversity and phylogenetic analysis of EG95 sequences of *Echinococcus granulosus*: Implications for EG95 vaccine application. *Asian Pac J Trop Med*. 10(5), 524-527.
154. Paredes, R., Godoy, P., Rodríguez, B., García, M.P., Cabezón, C., Cabrera, G., Jiménez, V., Hellman, U., Sáenz, L., Ferreira, A. and Galanti, N. (2011). Bovine (*Bos taurus*) humoral immune response against *Echinococcus granulosus* and hydatid cyst infertility. *J. Cell. Biochem*. 112, 189-199.
155. Parkinson, J., Wasmuth, J.D., Salinas, G., Bizarro, C.V., Sanford, C., Berrima, M., Ferreira, H.B. Zaha, A., Blaxter, M.L., Maizels, R.M., Fernández, C. (2012). A transcriptomic analysis of *Echinococcus granulosus* larval stages: Implications for Parasite

- Biology and Host Adaptation. PLOS Neglected Tropical Diseases. 6(11), e1897.
156. Parsak, C.K., Hanta, I., Koltas, I.S., Sakman, G., Akcam, T., Kuleci, S., Alabaz, O. (2007). The effectiveness of nitric oxide derivatives in hydatid disease. *Chir Gastroenterol.* 23, 296–299.
157. Patel, R. P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C. R., Jo, H. J., Freeman, B. A. and Darley Usmar, V. M. (1999). Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics.* 1411, 385-400.
158. Paul-Eugène, N., Kolb, J.P., Damais, C., Yamaoka, K., Dugas, B. (1994). Regulatory role of nitric oxide in the IL-4-induced IgE production by normal human peripheral blood mononuclear cells. *Lymphokine. Cytokine Res.* 13, 287–293.
159. Pawlowski, Z.S., Eckert J., and Vuitton, D. A. (2001). A public health problem of global concern, in *WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals*, J. Eckert, M. A. Gemmel, F. X. Meslin, and Z. S. Pawlowski. Eds. 20–71.
160. Pedrosa, J., Saíz, A., Arrazola, J., Ferreirós, J., Pedrosa, C.S. (2000). Hydatid disease: radiologic and pathologic features and complications. *Radiographics.* 20(3), 795-817.
161. Pfarr, K. M., Fuhrman, J. A. (2000). *Brugia malayi*: localization of nitric oxide synthase in a lymphatic filariid. *Experimental Parasitology.* 94 (2), 92–98.
162. Pfarr, K. M., Qazi, S., Fuhrman, J. A. (2001). Nitric oxide synthase in filariae: demonstration of nitric oxide production by embryos in *Brugia malayi* and *Acanthocheilonema viteae*. *Experimental Parasitology.* 97, (4)205–214.
163. Possenti, A., Manzano-Román, R., Sánchez-Ovejero C., Boufana, B., La Torre G., Siles-Lucas, M., Casulli, A. (2017). Potential Risk Factors Associated with Human Cystic Echinococcosis: Systematic Review and Meta-analysis, 11(7):e0005801.
164. Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K., Hofmann, W.K., Heeschen, C., Aicher, A., Kollipara, R., DePinho, R.A., Zeiher, A.M., Dimmeler, S. (2005). Involvement of foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 115, 2382-2392.
165. Raza, H., Saoula, H., Belkhef, M., Medjeber, O., Soufli, I., Toumi, R., de Launoit, Y., Moralès, O., Nakmouche, M., Delhem, N., Touil-Boukoffa C. (2013). IL-23/IL-17A axis correlates with the nitric oxide pathway in inflammatory bowel disease: immunomodulatory effect of retinoic acid. *J Interferon Cytokine Res.* 33(7), 355-68.
166. Rafikova, O., Rafikov, R., Nudler, E. (2002). Catalysis of S-nitrosothiols formation by serum albumin: the mechanism and implication in vascular control. *Proc Natl Acad Sci.* 99, 5913–5918.
167. Ratovitski, E. A., Alam, M. R., Quick, R. A., McMilan, A., Bao, C., Kozlovsky, C., Hand, T. A., Johnson, R. C., Mains, R. E., Eipper, B. A., and Lowenstein, C. J. (1999). Kalirin Inhibition of Inducible Nitric-oxide Synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 993-999.
168. Ravi, K., Brennan, L.A., Levic, S., Ross, P.A., Black, S.M. (2004). S-nitrosylation of endothelial nitric oxide synthase is associated with monomerization and decreased

- enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* .101, 2619-2624.
169. Refik, M., Mehmet, N., Duemaz, R. (2005). Postoperative changes in serum cytokines profile and nitric oxide levels in patients with cystic echinococcosis. *Parasite*. 1, 265–269.
170. Rigano, R., Profumo, E., Ioppolo, S., Notargiacomo, S., Ortona, E., Teggi, A., Siracusano, A. (1995). Immunological markers indicating the effectiveness of pharmacological treatment in human hydatid disease. *Clin Exp Immunol*. 102, 281–285.
171. Rigano, R., E. Profumo, F. Bruschi, G. Carulli, A. Azzara, S. Ioppolo, B. Buttari, E. Ortona, P. Margutti, A. Teggi, and A. Siracusano. (2001). Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect. Immun*. 69, 288–296.
172. Rigano, R., Buttari, B., Profumo, E., Ortona, E., Delunardo, F., Margutti, P., Mattei, V., Teggi, A., Sorice, M., Siracusano, A. (2007). *Echinococcus granulosus* antigen B impairs human dendritic cell differentiation and polarizes immature dendritic cell maturation towards a Th2 cell response. *Infect Immun*. 75, 1667–1678.
173. Ripert, C., (1998). *Epidémiologie des maladies parasitaires–Helminthiases*. Ed. Med. Int. 3^{ième} édition Tome II .277-309.
174. Robbins, R.A., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Buttery, L.D, Wilson, A.J., Adcock, I.M, Riveros-Moreno, V., Moncada, S., Polak, J., et al.(1994). Inducible nitric oxide synthase is increased in murine lung epithelial cells by cytokine stimulation. *Biochem Biophys Res Commun*. 198, 835-843.
175. Rogan, M.T., Richards, K.S. (1987). *Echinococcus granulosus*: changes in the surface ultrastructure during protoscolex formation. *Parasitology*. 94 (Pt2), 359-67.
176. Rogan, M.T., Hai, W.Y., Richardson, R., Zeyhle, E., Craig, P.S. (2006). Hydatid cysts: does every picture tell a story? *Trends Parasitol*. 22(9), 431–8.
177. Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. (1998). *Immunology*. 5th edition Mosby Publication, London, 132-133, 235, 246, 247, 314.
178. Romig, T., Zeyhle, E., Macpherson, C.N., Rees, P.H., Were, J.B., (1986). Cyst growth and spontaneous cure in hydatid disease. *Lancet* 1, 861.
179. Romig, T., Ebi, D., Wassermann, M. (2015). Taxonomy and molecular epidemiology of *Echinococcus granulosus sensu lato*. *T. Veterinary Parasitology*. 213, 76–84.
180. Salvemini, D., de Nucci, G., Gryglewski, R. J. and Vane, J. R. (1989). Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 6328-6332.
181. Scott J.C., Stafaniak J., Pawłowski Z.S., McManus D.P. (1997). Molecular genetic analysis of human cystic hydatid cases from Poland: identification of a new genotypic group (G9) of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology*. 114, 37-43.
182. Selbach, M. and M. Mann (2006). "Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK). *Nat Methods*. 3(12), 981-983.

183. Sennequier, N., & Vadon-Le Goff, S. (1998). Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO): mécanisme, régulation et contrôle. *MS. Médecine sciences*, 14(11), 1185–1195.
184. Shaafie, I.A., Khan, A., and Rambabu, K. (1999). Biochemical profiles of hydatid cyst fluids of *E. granulosus* of human and animal origin in Libya. *J. Helminthol.* 73, 253-258.
185. Shapiro, S. Z., G. M. Bahr, and P. R. Hira. (1992). Analysis of host components in hydatid cyst fluid and immunoblot diagnosis of human *Echinococcus granulosus* infection. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 86, 503–509.
186. Shepherd J. C. and McManus D. P. (1987). Specific and crossreactive antigens of *Echinococcus granulosus* hydatid cyst fluid," *Molecular and Biochemical Parasitology.* 25 (2), 143–154.
187. Shepherd, J. C., Aitken A., McManus, D. P. (1991). A protein secreted *in vivo* by *Echinococcus granulosus* inhibits elastase activity and neutrophil chemotaxis. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 81–90.
188. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68, 850–858.
189. Siles-Lucas, M.M., Gottstein, B. (2001). Molecular tools for the diagnosis of cystic and alveolar echinococcosis. *Trop. Med. Int. Health.* 6, 463–475.
190. Siles-Lucas, M., Merli, M., Gottstein, B. (2008). 14-3-3 Proteins in *Echinococcus*: Their role and potential as protective antigens. *Experimental Parasitology.* 119(4), 516–523.
191. Siracusano, A., Bruschi, F. (2006). Cystic echinococcosis: progress and limits in epidemiology and immunodiagnosis. *Parassitologia*, 48, 65–66.
192. Siracusano, A., Riganò, R., Ortona, E., Profumo, E., Margutti, P., Buttari, B., et al. (2008a). Immunomodulatory mechanisms during *Echinococcus granulosus* infection. *Exp Parasitol.* 119, 483–9.
193. Siracusano, A., Margutti, P., Delunardo, F., Profumo, E., Riganò, R., Buttari, B., et al. (2008b). Molecular cross-talk in host–parasite relationships: the intriguing immunomodulatory role of *Echinococcus* antigen B in cystic echinococcosis. *Int J Parasitol.* 38, 1371–6.
194. Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A., Ortona, E. (2012a). Host-Parasite Relationship in Cystic Echinococcosis: An Evolving Story. *Clinical and Developmental Immunology.* Volume 2012, Article ID 639362, 12 pages.
195. Siracusano, A., Delunardo, F., Teggi, A., Ortona, E. (2012b). Cystic Echinococcosis: Aspects of Immune Response, Immunopathogenesis and Immune Evasion from the Human Host. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders. Drug Targets.* 12, 16-23.
196. Smyth, J.D. (1990) in *In Vitro Cultivation of Parasitic Helminths* (ed. Smyth, J.D.) 77–154 (CRC Press, Boca Raton, Florida, 33431.
197. Smyth, T., Harris, H.J., Brown, A., Töttemeyer, S., Farnfield, B.A., Maskell, DJ, Matsumoto M, Plevin R, Alldridge, L.C., Bryant CE (2006) Differential modulatory effects of annexin 1 on nitric oxide synthase induction by lipopolysaccharide in macrophages. *Immunology.* 117(3), 340.

198. Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., Touil-Boukoffa, C. (2015). Chapter in book. New insights into inflammatory Bowel Disease Cytokine and Nitric Oxide in Immunopathogenesis of IBD and Potentiel Therapeutic Approaches. DOI105772/65001.
199. Soufli, I., Toumi, R., Rafa, H., Touil-Boukoffa, C. (2016). Overview of cytokines and nitric oxide involvement in immuno-pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 7(3), 353-60.
200. Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J. A. et al. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitrosoadduct of serum albumin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7674-7677.
201. Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keaney, J., Vita, J., Loscalzo, J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 89(16), 7674-7677.
202. Stempin, C.C., Cerban, F.M. (2007). Macrophages and arginase induction as a mechanism for parasite escape. *Medicina.* 67, 737-46.
203. Sutherland, T.E., Logan, N., Rückerl D., Humbles, A.A., Allan, S.M., Papayannopoulos V, Stockinger B., Maizels, R.M., and Allen, J.E. (2014). Chitinase-like proteins promote IL-17-mediated neutrophilia in a trade-off between nematode killing and host damage. *Nat Immunol.* 15(12), 1116-1125.
204. Tadie, J.M., Henno, P., Leroy, I., Danel, C., Naline, E., Faisy, C., Riquet, M., Levy, M., Israel-Biet, D., Delclaux, C. (2008). Role of nitric oxide synthase/arginase balance in bronchial reactivity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294, L489-497.
205. Taylor B. S. and Geller D. A. (2000) Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock.* 13(6), 413-424.
206. Thompson, R.C.A., & Lymbery, A.J. (1990). *Echinococcus*: biology and strain variation. *Int. J. Parasitol.* 20, 457-470.
207. Taylor Robinson, A.W., Lie FY, Severn, A. (1994). Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by Th1 and Th2 cells. *Eu J Immunol.* 24, 980-984.
208. Thompson, R.C., Lymbery, A.J., Constantine, C.C. (1995). Variation in *Echinococcus*: towards a taxonomic revision of the genus. *Adv. Parasitol.* 35, 145-176.
209. Thompson, R.C.A. (1995). Biology and systematics of *Echinococcus*. In *Echinococcus* and hydatid disease (R.C.A. Thompson & A.J. Lymbery, eds). CAB International, Wallingford, 1-50.
210. Thompson, R.C., McManus, D. (2001). Aetiology: parasites and life-cycles. In: Eckert, J., Gemmell, M.A., Meslin, F.X., Pawowski, Z.S. (Eds.), WHO/OIE Manual on Echinococcosis in Humans and Animals: A Public Health Problem of Global Concern. World Health Organisation / World Organisation of Animal Health, 1-16.
211. Thompson, R. C. A. and Lymbery, A. J. (2004). *Echinococcus* and hydatid disease, 1st ed. CAB International
212. Torrents, D., Prats, N., Vergara, P. (2003). "Inducible nitric oxide synthase inhibitors ameliorate hypermotility observed after *T. spiralis* infection in the rat," *Digestive*

- Diseases and Sciences*. 48, (6)1035–1049.
213. Touil-Boukoffa, C., Sanceau, J., Tayebi, B., and Wietzerbin, J. (1997). Relationship among circulating interferon, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-6 and serologic reaction against parasitic antigen in human hydatidosis. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 17(4), 211–217.
214. Touil-Boukoffa, C., Bauvois, B., Sancéau, J., Hamrioui, B., Wietzerbin, J. (1998). Production of nitric oxide (NO) in human hydatidosis: relationship between nitrite production and interferon-gamma levels. *Biochimie*. 80 (8-9), 739-44.
215. Trujillo, M., Ferrer-Sueta, G., Radi, R. (2008). Peroxynitrite detoxification and its biologic implications. *Antioxid Redox Signal*, 10(9), 1607-20.
216. Tyers, M., Mann, M. (2003). From genomics to proteomics. *Nature*. 422(6928), 193-7.
217. Vila-Del Sol V., Diaz-Munoz M. D. and Fresno M. (2007). Requirement of tumor necrosis factor inducible nitric oxide synthase in macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 81(1), 272-28.
218. Virag, L., Szabo, E., Gergely, P., Szabo, C. (2003). Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett.* 140–141, 113–124.
219. Virginio, V.G., Taroco, L., Ramos, A.L., Ferreira, A.M., Zaha, A., Ferreira, H.B., et al. (2007). Effects of protoscoleces and AgB from *Echinococcus granulosus* on human neutrophils: possible implications on the parasite's immune evasion mechanisms. *Parasitol Res.* 100, 935–42.
220. Virginio, V.G., Monteiro, K.M., Drumond, F., De Carvalho, M.O., Vargas, D.M., Arnaldo Zaha, A., Ferreira, H.B. (2012). Excretory/secretory products from *in vitro*-cultured *Echinococcus granulosus* protoscoleces. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 183, 15–22.
221. Vuitton, D.A. (2003) The ambiguous role of immunity in echinococcosis: protection of the host or of the parasite? *Acta Trop.* 85, 119–132.
222. Vuitton, D.A. (2004). Echinococcosis and allergy. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* 26(2), 93-104.
223. Wallingford, CAB International, 1995. (Cited: Radfar, M. H. and Iranyar, N. "Biochemical profiles of hydatid cyst fluids of *Echinococcus granulosus* of human and animal origin in Libya. *J Helminthol.* 73(3), 255-8.
224. Wang, Y., He, T., Wen, X., Li, T., Waili, A., Zhang, W., Xu, X., Vuitton, D.A., Rogan, M.T., Wen, H., Craig, P.S., (2006). Post-survey follow-up for human cystic echinococcosis in northwest China. *Acta Trop.* 98, 43–51.
225. Wang, Y., Xiao, D., Shen, Y., Han, X., Zhao, F., Li, X., Wu, W., Zhou, H., Zhang, J., and Cao, J. (2015). Proteomic analysis of the excretory/secretory products and antigenic proteins of *Echinococcus granulosus* adult worms from infected dogs. *BMC Veterinary Research.*, 11, 119 DOI 10.1186/s12917-015-0423-8.
226. Waters-Rist, A.L., Faccia, K., Lieverse, A., Vladimir, I., Bazaliiskii, V., Katzenberg M.A., Robert J. Losey, R.J. (2014). Multicomponent analyses of a hydatid cyst from an Early Neolithic hunter-gatherer

- from Lake Baikal, Siberia. *Journal of Archaeological Science*. 50, 51-62.
227. Wegerhoff, P. H., Wenk, P. (1979). Studies of acquired resistance of the cotton rat against microfilariae of *Litomosoides carinii*. I. Effects of single and repeated injections of microfilariae. *Z. Parasites*. 60. 50-64.
228. WHO-Informal Working Group on Echinococcosis, (2003). International classification of ultrasound images in cystic echinococcosis for application in clinical and field epidemiological settings. *Acta Trop*. 85, 253–261.
229. Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sanchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., Hochstrasser, D.F. (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology*. 14(1), 61-5.
230. Xiao, N., Qiu, J., Nakao, M., Li, T., Yang, W., Chen, X., Schantz, P.M., Craig, P.S., Ito, A. (2005). *Echinococcus shiquicus* n. sp., a taeniid cestode from Tibetan fox and plateau pika in China. *Int. J. Parasitol*. 35, 693–701.
231. Xu, Q., Hu, Y., Kleindienst, R., and Wick, G. (1997). Nitric Oxide Induces Heat-shock Protein 70 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Via Activation of Heat Shock Factor 1. *J. Clin. Invest*. 1089–1097.
232. Xu, W.M., Liu, L.Z. (1998) Nitric oxide: from a mysterious labile factor to the molecule of the Nobel Prize. Recent progress in nitric oxide research. *Cell Res*. 8, 251-58.
233. Yang, Y.R., Liu, X.Z, Vuitton, D.A., Bartholomot, B., Wang, Y.H., Ito, A., Craig, P.S, Macmanus, D.P. (2006) Simultaneous alveolar and cystic echinococcosis of the liver. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 100(6), 597-600.
234. Yu, R. Y., Sun, T., Li, Z. et al. (2006) "Community surveys and risk factor analysis of human alveolar and cystic echinococcosis in Ningxia Hui Autonomous Region, China," *Bulletin of the World Health Organization*. 84(9), 714–721.
235. Zahed, N.Z. (2009). Histological Effects of Cystic Echinococcosis on the Liver of Sheep. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 37, 656-663 656.
236. Zait, H., Boulahbel, M., Normand, A.C., Zait, F., Achir, I., Guerchani, M.K., Chaouche, H., Ladjadj, Y., Hamrioui, B. (2014). Parasitological study of 78 cases of human cystic echinococcosis collected between 2005 to 2012 in Mustapha hospital center of Algiers. *Pathol Biol*. 62(6), 369-76.
237. Zait, H., Kouidri, M., Grenouillet, F.E., Umhang, G., Million, L., Hamrioui, B., Grenouillet, F. (2016). Molecular characterization of *Echinococcus granulosus sensu stricto* and *Echinococcus canadensis* in humans and livestock from Algeria. *Parasitol. Res*. 115(6), 2423-31.
238. Zeghir-Bouteldja, R., Amri, M., Ait Aissa, S., Bouaziz, S., Mezioug, D., Touil-Boukoffa, C. (2009). *In vitro* study of nitric oxide metabolites effects on human hydatid of *Echinococcus granulosus*. *J. Parasitol. Res*. 624919, 1–7.
239. Zeghir-Bouteldja, R., Amri, M., Bouaziz, S., Mezioug, D., Touil-Boukoffa, C. (2013). Comparative study of nitric oxide (NO) production during human hydatidosis: relationship with cystic fluid fertility. *Parasitology Research*. 112 (2), 649-654.

240. Zhang, L.H., Chai, J.J., Jiao W., Osman Y. & McManus, D.P. (1998a). – Mitochondrial genomic markers confirm the presence of the camel strain (G6 genotype) of *Echinococcus granulosus* in north-western China. *Parasitology*. 116, 29-33.
241. Zhang, L.H., Eslami, A., Hosseini, S.H. & McManus D.P (1998b). Mitochondrial DNA markers compared for human and animal isolates indicate the presence of two distinct strains of *Echinococcus granulosus* in Iran. *Am. J. trop.Med. Hyg.* 59, 171-174.
242. Zhang, W., Li, J., and McManus, D.P. (2003). Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 16(1), 18–36.
243. Zhang, W., Wang, S., McManus, D.P.(2014). *Echinococcus granulosus* genomics: a new dawn for improved diagnosis, treatment, and control of echinococcosis. *Parasite*. 21, 66.
244. Zheng, H., Zhang W., Zhang L. et al. (2013) The genome of the hydatid tapeworm *Echinococcus granulosus*. *nature genetics* Nature GeNetics, 45(10), 1168-1174. doi:10.1038/ng.275714: 109–121, 2006.
245. Zheng, Y. (2017) Proteomic analysis of *Taenia hydatigena* cyst fluid reveals unique internal microenvironment. *Acta Trop.* 6, 224-227. doi: 0.1016/j.actatropica.2017.08.015.
246. Zong Ji, L., et Wei, Z. (2012). Analysis of Protoscoleces-specific Antigens from *Echinococcus Granulosus* with Proteomics Combined with Western Blot. *Biomed Environ Sci.* 25(6), 718-723.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

-**Analyse protéomique** : analyse systématique des profils de protéines dans des extraits protéiques donnés. La génomique permet d'établir les relations entre l'activité d'un gène.

-**Immunome**: Il s'agit de tous les gènes et les protéines associés au système immunitaire.

-**NCBI**: Le National Center for Biotechnology Information (**NCBI**), Centre américain pour les informations biotechnologiques est un institut national américain pour l'information biologique moléculaire.

-**Transcriptome** : L'ensemble des molécules d'ARN à n'importe quel moment dans une cellule ou dans une population de cellules. Le transcriptome est dynamique, étant donné que les niveaux des transcrits d'ARN varient au cours des différents stades de développement ou en réponse à certaines conditions. .

-**UniProt**: est une base de données des séquences de protéines. Son nom dérive de la contraction de « *Universal Protein Resource* » (base de données **universelle** des **protéines**). C'est une base de données ouverte, stable et accessible en ligne. UniProt fournit des informations sur leur fonction et leur structure ainsi que des liens vers d'autres bases de données.

Résumé

L'hydatidose est une parasitose endémique en Algérie. Elle est causée par la forme larvaire d'un cestode appelé *Echinococcus granulosus*. L'étude de la réponse immunitaire développée contre ce parasite et menée par notre équipe a mis en exergue l'implication du NO dans l'action anti hydatique. Nos travaux antérieurs ont souligné un effet dégénératif et scolicide exercé par le NO et ses dérivés (Zeghir-Bouteldja et al., 2009). L'étude réalisée s'intègre dans le cadre de la poursuite des travaux développés par notre équipe. Elle est axée sur deux volets interactifs. Le premier a porté sur l'étude des effets du NO selon les différentes localisations kystiques de l'hydatidose (fréquentes et rares), la viabilité des kystes ainsi que leur fertilité. Le deuxième volet utilisant une analyse protéomique du liquide hydatique issu de kystes provenant de patients atteints de localisations fréquentes et rares, a ciblé la caractérisation de plusieurs protéines douées d'activités physiologiques et physiopathologiques, **dont les NO Synthases** résultant de l'interaction **Hôte/ Parasite**. Les résultats ont été très intéressants et ont abouti aux données suivantes :

1/Les effets du NO sont tributaires des différentes localisations kystiques de l'hydatidose et impliquent plusieurs facteurs, la variabilité antigénique, l'hétérogénéité moléculaire de la larve hydatique, la viabilité des kystes ainsi que leur fertilité. 2/Les protéines excrétées par la larve hydatique semblent jouer un rôle crucial dans la protection du macroparasite contre les effets NO en faveur de leur persistance mettant en jeu une dualité fonctionnelle exercée par le NO selon la source des NOS, l'hôte ou le parasite (effet délétère ou protecteur). Dans son ensemble, l'analyse protéomique du liquide hydatique effectuée a un impact certain sur l'élucidation des mécanismes de survie mis en jeu par le parasite vis-à-vis l'hôte. De plus, la caractérisation de nouvelles protéines hydatiques impliquées à la fois dans la physiologie du parasite et des dommages induits chez l'hôte constitue des perspectives prometteuses dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, de prévention, de suivi et de diagnostic.

Mots clés : *Echinococcus granulosus*, monoxyde d'azote, localisation kystique, protéomique

Abstract

Hydatidosis is an endemic parasitosis in Algeria. It is caused by the larval form of a cestode *Echinococcus granulosus*. Immunological studies conducted in this context indicated NO involvement against *Echinococcus granulosus*. This effect is upregulated by IFN-gamma. In this way, our previous study underlines a degenerative and a scolicial effect of NO and its derivatives (Zeghir-Bouteldja and *al.*, 2009). Our current work is composed of two interactive parts. The first is conducted about NO effects according to the different cystic locations (frequent and rare), and the viability of cysts as well as their fertility. The second is conducted using proteomic analysis of hydatid fluids from hydatid patients showing frequent and rare locations.

Our results show that NO is highly implicated during all the forms of hydatidosis and its effect is dependent of cystic location and fertility, viability, antigenic and larval biomolecules variations. The proteomic analysis performed on hydatid fluid is useful in the elucidation of the survival mechanisms used by the parasite against the host. The characterisation of new hydatid proteins involved both in parasite physiology and induced damage in host constitutes a promising tool in the development of new therapeutic strategies, in prevention, in diagnosis and in monitoring patients.

Key words: *Echinococcus granulosus*, nitric oxide, cystic location, proteomics.

ملخص

مرض الكيس المائي هو مرض طفيلي منتشر في الجزائر. وهو ناتج عن تشكل يرقات الدودة الشريطية. أبرزت دراسة الاستجابة المناعية ضد هذا الطفيلي دور احادي اوكسيد الازوت وقد أبرزت الدراسات السابقة تأثير احادي الازوت ومشتقاته في اطار مكافحة مرض الكيس المائي. اظهرت بعض الدراسات التي اجريت سابقا تأثيره في القضاء علي اليرقات. تعتبر هذه الدراسة جزء من العمل المستمر الذي وضعه فريق البحث. وهو يركز على جانبيين. تضمن الجانب الاول تأثيرات احادي اوكسيد الازوت تبعا لمواقع تواجد الكيس المائي، حيويته وخصوبته. ويعتمد الجزء الثاني على استخدام تحليل البروتينات المتواجدة في سائل الاكياس المائية المتحصل عليها بعد استئصالها جراحيا لدى المرضى الذين يعانون من الاصابة في المواقع المعتادة والنادرة، و استهدف تشخيص البروتينات التي لديها دور فزيولوجي و مرضي الناتجة عن العلاقة بين المضيف و الطفيلي. وكانت النتائج مثيرة جدا للاهتمام وأسفرت عن البيانات التالية: 1 / تأثيرات احادي الازوت تتعلق بعوامل مختلفة و تتضمن عدم التجانس الجزيئي، خصوبة يرقة الكيس المائي. 2 / يبدو ان البروتينات التي تفرزها اليرقات العذارية تلعب دورا حاسما في حماية الطفيلي من تأثير احادي اوكسيد الازوت لتسمح لها بالاستمرارية على مستوى المضيف. فلا حادي الازوت وظيفة مزدوجة تمارسها اعتمادا على مصدر المضيف أو الطفيلي (تأثير ضار أو وقائي). وعموما، جعلت تحليل البروتين المتواجدة في سائل الكيسة المائية بعض التأثير على توضيح آليات بقاء الطفيلي على مستوى المضيف. وعلاوة على ذلك، فإن توصيف بروتينات جديدة التي لها دور فزيولوجي على مستوى الطفيلي لحمايته من الأضرار التي يسببها المضيف وجهات نظر واعدة في تطوير استراتيجيات علاجية جديدة، والوقاية، و الرقابة والتشخيص.

الكلمات المفتاحية: *Echinococcus granulosus*, احادي اوكسيد الازوت, موقع الكيس المائي, توصيف البروتينات