



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Advancing helminth glycomics: structural specificity and immunogenicity of schistosomal and filarial glycans

Petralia, L.M.C.

Citation

Petralia, L. M. C. (2025, April 16). *Advancing helminth glycomics: structural specificity and immunogenicity of schistosomal and filarial glycans*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4212211>

Version: Publisher's Version

[Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

License: <https://hdl.handle.net/1887/4212211>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Résumé en Français

Introduction

Les helminthes, ou vers parasites, sont des agents infectieux largement répandus qui constituent un problème de santé publique majeur dans les pays en voie de développement et ont des répercussions négatives sur les plans économique et social. Les schistosomes et les nématodes filaires font partie des helminthes à l'origine de plusieurs maladies tropicales négligées (MTN), majoritairement présentes en Afrique sub-saharienne, en Amérique du Sud et au sud de l'Asie. Les vers du genre *Schistosoma* spp., principalement *S. haematobium* et *S. mansoni* chez l'Homme, causent la schistosomiase, ou bilharziose, une maladie parasitaire qui se propage lors de contact avec de l'eau douce contaminée. Avec plus de 200 millions de cas, la bilharziose est la deuxième maladie parasitaire mondiale après le paludisme.

Les filarioses, quant à elles, sont des helminthiases dues à des nématodes parasites, dits filaires, qui sont transmis par des insectes – moustiques, mouches, diptères. *Wuchereria bancrofti* and *Brugia* spp. causent la filariose lymphatique (FL), dont la conséquence la plus connue est l'éléphantiasis, tandis que l'onchocercose, ou « cécité des rivières » est due à *Onchocerca volvulus*. Au total, environ 70 millions d'individus seraient infectés et exposés aux conséquences sévèrement handicapantes de ces filarioses, qui provoquent des troubles chroniques du système lymphatique dans le cas de la FL et de la vision pour l'onchocercose.

Les helminthes parasites ont en commun la capacité de vivre durant de longues périodes (souvent plus d'une décennie) dans leur hôte mammifère. Pour survivre dans cet environnement hostile, ces parasites ont développé des mécanismes d'évasion pour réprimer la réponse immunitaire de leur hôte et y échapper, mais la plupart des acteurs moléculaires impliqués dans ces interactions restent à élucider. Une compréhension approfondie des interactions parasite-hôte apparait cependant nécessaire pour élaborer les thérapies (prophylactiques) actuellement requises pour combattre ces maladies et pour développer les outils diagnostiques qui permettraient la détection de ces parasites avec une précision optimale.

Sujets d'études et objectifs de cette thèse

Les glycanes sont des polymères composés de monosaccharides reliés entre eux par une liaison glycosidique qui sont impliqués dans de nombreux processus biologiques allant de la communication cellulaire aux interactions hôte-parasite. Ces molécules constituent par conséquent de potentielles cibles pour l'élaboration de

diagnostics et de traitements ou vaccins. Leur étude a cependant été négligée à bien des égards, de sorte que nos connaissances actuelles sur les glycanes des helminthes sont largement lacunaires. Le travail de recherche présenté dans cette thèse vise à faire progresser nos connaissances en étudiant (1) la structure des glycanes synthétisés par les schistosomes et les nématodes filaires (**chapitres 2-4**), (2) la réponse immunitaire humorale causée par les glycanes chez l'hôte infecté (**chapitres 2-4**) ainsi que (3) la manière dont les glycanes de l'hôte sont affectés par l'infection parasitaire (**chapitre 5**).

Questions abordées	Parasite Maladie (hôte, si approprié)	Type d'étude	Chapitre
(1) Quels glycanes sont synthétisés par les helminthes ?	<i>S. haematobium</i> & <i>S. mansoni</i> Schistosomiase	Étude structurale des glycanes utilisant la spectrométrie de masse (MS)	2
	<i>B. malayi</i> Filariose Lymphatique		3
	<i>O. volvulus</i> Onchocercose		4
(2) L'hôte infecté développe-t-il des anticorps reconnaissant les glycanes du parasite ?	<i>S. haematobium</i> & <i>S. mansoni</i> Schistosomiases (chez l'Homme)	Étude fonctionnelle des glycanes à l'aide de « microarrays »	2
	<i>B. malayi</i> Filariose Lymphatique (chez le macaque rhésus et chez l'Homme)		3
	<i>B. malayi</i> , <i>L. loa</i> , <i>M. perstans</i> , <i>O. volvulus</i> , <i>W. bancrofti</i> Filarioses (chez l'Homme)		4
(3) L'infection parasitaire altère-t-elle les glycanes de l'hôte ?	<i>B. malayi</i> Filariose Lymphatique (chez le macaque rhésus)	Étude structurale et quantitative des glycanes combinant MS et chromatographie liquide (UPLC profiling)	5

Synthèse des résultats

Si, lors de l'élaboration de ce projet de thèse, nos connaissances générales des glycanes des nématodes filaires étaient très réduites, les données résultant de décennies de recherche sur *S. mansoni* étaient en revanche disponibles dans la littérature. Ces travaux ont démontré que ce parasite synthétise des glycanes complexes, évoluant au cours de son cycle biologique et présentant des caractéristiques structurales uniques aux propriétés immunogènes et immunomodulatrices. En dépit de majeures différences biologiques (e.g. organe de résidence dans leur hôte définitif, pathologie, hôtes intermédiaires...), aucune étude comparable n'avait été conduite pour *S. haematobium*, pourtant l'espèce de

A

schistosome la plus répandue chez l'Homme. C'est pourquoi, dans le **chapitre 2**, nous avons étudié trois grandes classes de glycanes exprimés par ce parasite – les *N*-glycanes et les *O*-glycanes, dont les chaînes saccharidiques sont liées à des protéines, et les glycosphingolipides (GSLs). Utilisant des techniques basées sur la spectrométrie de masse (MS) et le séquençage enzymatique nous avons caractérisé les glycane de trois stades de développement du parasite *S. haematobium*, couvrant ainsi une grande partie de son cycle de vie. Les glycane synthétisés par *S. haematobium* varient nettement entre ces différents stades de développement et comprennent de nombreuses caractéristiques structurales ayant déjà été observées chez *S. mansoni*. Cependant, en comparant les mêmes stades de développement pour chacune des deux espèces, nous avons identifié des variations quantitatives très marquées dans l'expression de la plupart des motifs glycaniques. De plus, les GSLs de *S. haematobium* présentent des différences structurales majeures avec ceux de *S. mansoni* puisque la structure de base sur laquelle cette classe de glycane est construite diffère entre les deux espèces. Notre étude a aussi révélé que *S. haematobium* incorpore de l'acide glucuronique (GlcA) dans la composition de nombreux GSLs synthétisés par les vers adultes et leurs œufs, une brique constructive des glycane qui n'avait jusqu'alors jamais été rapportée dans les GSLs des schistosomes. À la suite de recherches approfondies, nous avons également détecté des GSLs contenant du GlcA dans les œufs de *S. mansoni* mais en proportion bien moindre que chez *S. haematobium*. L'utilisation de MS couplée à la chromatographie nano-liquide sur carbone graphite poreux (PGC-nano-LC-MS/MS), une technique particulièrement efficace pour la séparation d'isomères, a permis de mettre en évidence une nette différence en termes de fucosylation entre les œufs de *S. mansoni* et de *S. haematobium*. Les GSLs de ces derniers ne contiennent relativement que peu de fucoses, liés à la base de la chaîne glycanique ce qui contraste avec les multiples fucoses des GSLs de *S. mansoni*, souvent liés entre eux, formant des dimères et des trimères, localisés aux extrémités terminales des chaînes saccharidiques, dans la proximité immédiate du GlcA, lorsqu'il est présent. Afin de déterminer si les glycane des schistosomes provoquent une réponse immunitaire, nous avons évalué la présence d'anticorps dans le sérum d'individus infectés avec *S. haematobium* ou *S. mansoni*. Nous avons construit des microarrays comprenant les glycane précédemment caractérisés dont les structures différentielles entre les deux espèces. Leur analyse a révélé la présence d'immunoglobulines (Ig) G et M en abondance dans les sera infectés, démontrant qu'une grande majorité des glycane des schistosomes est immunogénique, et ce indifféremment de l'espèce de schistosome à l'origine de l'infection. Les motifs comprenant de multiples fucoses et l'épitope nouvellement identifié contenant du GlcA s'avèrent particulièrement antigéniques. Étonnamment, la quantité d'IgG se liant aux glycane contenant des résidus de GlcA est largement supérieure dans les sera d'individus infectés par *S. haematobium* ce qui indique que les différences structurales

observées sont à l'origine de différentes réponses en IgG. Ces spécificités en termes de glycobiologie pourraient être exploitées à des fins diagnostiques, notamment pour permettre une détection et une discrimination plus efficaces des infections avec *S. haematobium* en développant un test sérologique.

Nous initions ensuite notre étude des glycanes des nématodes filaires dans le **chapitre 3**, avec la caractérisation des *N*-glycans et des GSLs de *Brugia malayi*, une des espèces responsables de la FL. De nombreux glycans sont composés de phosphorylcholine (PC), un substituant courant chez les nématodes filaires, connu pour ses propriétés immunomodulatoires. En accord avec la littérature, ce substituant est fréquemment lié aux résidus de N-acétylhexosamine (HexNAc), mais nous l'avons aussi observé lié aux mannoses des *N*-glycans. La présence de fucose, de GlcA en position terminale des chaînes saccharidiques, ou bien de galactose en liaison α (α -Gal), parfois fucosylé, font partie des autres caractéristiques notables des glycans de *B. malayi* mises en évidence dans cette étude. À l'aide d'un microarray composé de glycans provenant de *B. malayi*, nous avons pu déterminer que l'hôte infecté développe des IgG et IgM en réponse à ces traits non-mammaliens. Certains GSLs aux propriétés anioniques et zwitterioniques apparaissent particulièrement antigéniques à la fois chez l'hôte humain et chez le macaque rhésus. Des sera de macaques rhésus appartenant à une cohorte longitudinale ont en effet été analysés et se sont révélés informatifs concernant les dynamiques d'apparition des anticorps reconnaissant les glycans du parasite pendant l'établissement de la LF. Très tôt, des IgM sont détectables dans le sérum mais leur nombre diminue au cours de l'infection, alors que la réponse en IgG augmente progressivement à partir de 5 semaines post-infection et reste élevée par la suite. Chez l'Homme, lors d'infections chroniques avec *B. malayi*, nous avons en revanche constaté une nette diminution des IgG reconnaissant les glycans parasitaires dans le sérum après traitement avec un antihelminthique, ce qui constitue un résultat prometteur pour des applications diagnostiques potentielles.

La spécificité et la réactivité croisée des anticorps est un aspect primordial à prendre en compte dans l'optique d'une application diagnostique. Dans le cas des glycans des nématodes filaires, des rapports préalables font état de caractéristiques structurales communes au sein de ce phylum. C'est pourquoi le travail conduit dans le **chapitre 4** vise à comparer les réponses en anticorps aux glycans de *B. malayi* pour les cinq filariose les plus répandues chez l'Homme. Ainsi, en plus de *B. malayi*, la réponse en IgG dans les sera d'individus infectés par *O. volvulus*, *Mansonella perstans*, *Loa loa* ou *W. bancrofti* a été étudiée à l'aide de nos microarrays. Tous les sera d'individus infectés contiennent des IgG reconnaissant les GSLs terminés par un α -Gal, ainsi que certains GSLs composés de PC, indiquant que dans toutes les filariose examinées le système immunitaire de l'hôte est exposé à ces traits glycaniques. Par ailleurs, nous avons observé des réponses en IgG très similaires chez les individus infectés par *B. malayi*, *O. volvulus* ou *M. perstans*, avec la présence d'IgG

reconnaissant beaucoup plus de motifs glycaniques du parasite *B. malayi* dans ces sera que dans les contrôles ou dans les sera d'individus infectés par *Loa loa* ou *W. bancrofti*. Cette réactivité croisée a pu être largement expliquée lors de l'étude structurale des glycanes de *O. volvulus* effectuée dans ce même chapitre. En effet, nous avons observé une grande ressemblance entre les *N*-glycans et GSLs de ce parasite et ceux de *B. malayi*. Nous nous sommes ensuite intéressés aux différentes sous-classes d'immunoglobulines dont les propriétés respectives, et donc leur potentiel pour des utilisations diagnostiques, varient largement. Pour cela, nous avons étudié les sous-classes d'IgG dans les sera les plus réactifs, à savoir ceux des individus infectés par *B. malayi*, *O. volvulus* et *M. perstans*. Les IgG1 et IgG2 apparaissent comme les sous-classes responsables de la plus grande partie de la réponse globale en IgG aux glycans parasitaires. Il est intéressant de noter qu'à la suite du traitement antihelminthique mentionné précédemment, ce sont les IgG2 qui diminuent de la manière la plus drastique dans le sérum des individus infectés par *B. malayi*. Les résultats obtenus dans ce chapitre démontrent la complexité de la réponse immunitaire provoquée par les glycans parasitaires et contribuent à différencier les traits glycaniques communs aux différentes filariose, de ceux spécifiques pour une filariose, ou un petit groupe d'infections, qui détiennent un potentiel diagnostique important.

Les maladies infectieuses sont connues pour pouvoir être à l'origine de glycosylations aberrantes chez l'hôte, notamment dues à la dérégulation des glycotransférases et/ou de l'activité des glycosidases impliquées dans leur synthèse. La plupart des protéines du sérum étant glycosylées chez les mammifères, ce fluide constitue une interface privilégiée pour observer de potentielles altérations dues à la présence d'un agent infectieux. La cohorte longitudinale de macaques rhésus infectés par *B. malayi* nous a permis d'explorer cet aspect de la LF. Dans le **chapitre 5**, nous avons caractérisé les *N*-glycans du sérum et des IgG chez le macaque rhésus sain à l'aide d'une méthode préalablement validée de chromatographie en phase liquide à ultra-haute performance par interaction hydrophile (HILIC-UPLC) combinée à de la MS. En plus d'améliorer nos connaissances actuelles de la glycosylation chez cet animal, souvent utilisé comme modèle expérimental, ces données nous ont servi de références chez l'individu sain pour suivre les altérations des *N*-glycans provoquées par le parasite *B. malayi* durant l'établissement de l'infection. Nous avons observé de nombreux changements affectant un grand nombre de *N*-glycans, détectables rapidement post-infection, avant même l'apparition de microfilaires circulant dans le sang. La plupart de ces changements semblent être monodirectionnels, c'est-à-dire que nous observons soit une augmentation soit une diminution progressive de *N*-glycans particuliers au cours de l'infection, mais peu de fluctuations. Il en résulte une diminution globale des glycans composés d'acide sialiques compensée par une augmentation des structures galactosylées et mannosylées. Il est à noter que ces

résultats ne sont pas identiques à ceux obtenus lors d'une étude similaire conduite chez des chiens infectés par le nématode filaire *Dirofilaria immitis*, ce qui indique que les changements observés pourraient être spécifiques pour une infection et/ou pour l'espèce infectée. De manière générale, cette étude démontre les conséquences majeures d'une infection parasitaire sur la (glyco)biologie de l'hôte. Par la suite, il serait intéressant d'identifier quelles sont les protéines glycosylées qui sont altérées dans le sérum durant l'infection et qui sont à l'origine des changements globaux reportés dans ce chapitre. En effet, identifier ces protéines ainsi que les sites d'altérations exacts sur ces protéines à l'aide de techniques de glycoprotéomiques ciblées pourrait révéler d'efficaces biomarqueurs.

Conclusion

Le travail présenté dans cette thèse s'intéresse à de nombreux aspects de la glycosylation dans les schistosomiases et les filarioSES. En caractérisant la structure précise de glycanes parasitaires jusqu'alors inconnues, nos études approfondissent nos connaissances actuelles de la glycosylation chez les helminthes. Nos recherches contribuent aussi à améliorer notre compréhension de la réponse humorale que causent les glycans parasitaires chez l'hôte infecté et fournissent de nouvelles données concernant les altérations des N-glycans dans le sérum de l'hôte provoquées par ces infections. Elles constituent un ensemble d'informations précieuses pour lutter contre les maladies parasitaires dévastatrices que sont les schistosomiases et les filarioSES.