

## SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	i
GLOSSAIRE.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	iv
LISTE DES FIGURES.....	v
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>GENERALITES SUR LA CYSTICERCOSE.....</b>	<b>3</b>
A. LE PARASITE : <i>T. solium</i> .....	3
B. REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET EPIDEMIOLOGIQUE.....	6
C. LA CYSTICERCOSE PORCINE.....	9
D. MOYENS DE DIAGNOSTICS DE LA CYSTICERCOSE PORCINE.....	11
E. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	18
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>20</b>
I.    METHODOLOGIE GLOBALE.....	20
A. COLLECTION DE SERUMS DE PORCS.....	20
B. ANTIGENES DE <i>T.solium</i> .....	21
II.    TESTS SEROLOGIQUES.....	23
1. Test ELISA.....	23
a. Principe du test ELISA .....	23
b. Mise au point de la technique ELISA CS50.....	23
c. Validation des protéines recombinantes par la technique ELISA.....	25
2. Test WESTERN BLOT (EITBCS50) .....	27
<b>RESULTATS.....</b>	<b>28</b>
I.    CLASSIFICATION DES SERUMS DE PORCS.....	28
II.    MISE AU POINT DE L'ELISA CS50 .....	30
III.    ANALYSE DE LA QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES.....	33
IV.    VALIDATION DES PROTEINES RECOMBINANTEST8, T14 et T18.....	33

1. Antigénicité et seuil de positivité.....	33
2. Détermination de la spécificité et de la sensibilité .....	35
3. Etude des réactions croisées.....	36
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	40
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	41
ANNEXE I.....	I
ANNEXE II.....	III

## LISTE DES ABREVIATIONS

€ :	Euro
Ag:	Antigène
Ac:	Anticorps
Ag-ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay pour la détection d'un antigène
ABZ:	Albendazole
<i>C. cellulosa</i> :	<i>Cysticercus cellulosa</i>
Con-A:	Concanavaline A
CS50:	Crud Substract 50 (Extrait totale des glycoprotéines de <i>Taenia solium</i> )
DO:	Densité optique
DRZV:	Département de Recherches Zootechnies et Vétérinaires
DSV :	Département des Services Vétérinaires
EITB:	ElectroImmuno-Transfert Blot
ELISA:	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
FOFIFA:	"Foiben'ny Fikarohana ho Fampanandrosoana ny enyAmbanivohitra"
GP :	Glycoprotéine
HRP :	Horse Radish Peroxidase
IMI :	Immunologie des Maladies Infectieuses
IPM:	Institut Pasteur de Madagascar
kDa:	Kilodalton
MBP :	Maltose Binding-Protein
LNDV:	Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaires
LLGP:	Lentil Lectin Glycoprotein Purified
OMS:	Organisation Mondiale de la Santé (WHO: World Health Organisation)
OPD:	Orthophenylène diamine dihydrochloride
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PBS-T:	Phosphate Buffer Saline-Tween
PCR:	Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TMB:	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
<i>T. solium</i> :	<i>Taenia solium</i>
WB:	Western Blot

## GLOSSAIRE

**Antigène:** macromolécule (peptide, protéine, polysaccharide, glyco-lipide) du soi ou du non-soi, qui est reconnue comme étrangère à l'organisme et qui déclenche une réponse immunitaire visant à l'éliminer.

**Coprophage :** comportement alimentaire observé chez de nombreux animaux et qui consiste à se nourrir d'excréments.

**Cysticercose :** pathologie due à une infestation par des larves de *T. solium* (cysticerques), qui se développe dans différents organes (muscles, œil, cerveau, cœur, ...) après ingestion des œufs du parasite présents dans les selles humaines.

**Céphalée :** douleur locale ressentie au niveau de la boîte crânienne ou parfois de la nuque.

**Epilepsie :** affection neurologique du système nerveux central. L'épilepsie correspond à la survenue de crises convulsives répétées. Ces crises traduisent un dérèglement soudain et transitoire de l'activité électrique du cerveau, qui devient trop importante. Elles apparaissent sans cause identifiée, ou sont liées à une lésion cérébrale acquise suite à un traumatisme ou une infection.

**Hôte intermédiaire :** se dit d'un être vivant (vertébré ou invertébré) dans l'organisme duquel un parasite se développe à l'état larvaire ou dans une phase d'immaturité sexuelle.

**Hôte définitif :** se dit d'un être vivant (vertébré ou invertébré) dans l'organisme duquel vit un parasite effectue sa reproduction sexuée et atteint l'état adulte, mature sexuellement.

**Neurocysticercose :** infection du système nerveux central par des cysticerques de *Taenia solium*.

**Parasitose :** englobe toutes les maladies causées par un parasite (maladies parasitaires).

**Spécificité :** ou sélectivité d'un test, mesure sa capacité à donner un résultat positif lorsqu'une hypothèse est vérifiée.

**Sensibilité :** mesure la capacité d'un test à donner un résultat négatif lorsque l'hypothèse n'est pas vérifiée.

**Téniase :** parasitose intestinale causée par le ver solitaire *Taenia solium* dans sa forme adulte.

**Zoonose** : maladie et infection dont les agents se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa. Le terme a été créé au XIX<sup>e</sup> siècle, à partir du grec zôon, « animal » et nosos, « maladie », par Rudolf Virchow.

## LISTE DES TABLEAUX

	<i>Pages</i>
<b>Tableau 1:</b> Caractérisation des 63 sérums de porcs à utiliser dans les mises au point des ELISA sur CS50 ou sur protéines recombinantes	<b>29</b>
<b>Tableau 2:</b> Conditions expérimentales optimisées pour la détection des anticorps anti- <i>T. solium</i> présents dans les sérums de porc	<b>30</b>
<b>Tableau 3:</b> Conditions retenues pour la réalisation des ELISA-CS50-porc	<b>32</b>
<b>Tableau 4:</b> Seuil de positivité des protéines recombinantes	<b>34</b>
<b>Tableau 5:</b> Nombre de sérums positifs par ELISA sur protéines recombinantes par rapport au test de référence sérologique EITB-CS50	<b>35</b>
<b>Tableau 6:</b> Tableau de contingence pour le calcul de la spécificité (Sp) et de la sensibilité (Se) des tests ELISA sur protéines recombinantes	<b>35</b>
<b>Tableau 7:</b> Évaluation de la sensibilité et spécificité des tests ELISA réalisés avec les trois protéines recombinantes de <i>T. solium</i>	<b>36</b>

## LISTE DES FIGURES

	<i>Pages</i>
<b>Figure 1:</b> Illustrations du parasite <i>Taenia solium</i> : Ver adulte (A), scolex (B), œufs (C) et cysticerque (D).	<b>4</b>
<b>Figure 2:</b> Représentation schématique du cycle de vie et de transmission du parasite <i>Taenia solium</i>	<b>5</b>
<b>Figure 3:</b> Répartition mondiale des zones endémiques pour <i>T. solium</i>	<b>7</b>
<b>Figure 4:</b> Distribution de la cysticerose humaine à Madagascar : nombre de suspicions de cas de cysticerose humaine pour 100 000 habitants	<b>8</b>
<b>Figure 5:</b> Distribution du cheptel porcin et des cas de cysticerose porcine à Madagascar	<b>10</b>
<b>Figure 6:</b> Prévalence de la cysticerose porcine basée sur la détection de lésions dues aux cysticerques de <i>T. solium</i> lors de l'inspection post-mortem	<b>11</b>
<b>Figure 7:</b> Diagnostic sérologique de la cysticerose/neurocysticerose par la technique d'EITB	<b>14</b>
<b>Figure 8:</b> Méthodologie globale du stage de Master	<b>20</b>
<b>Figure 9:</b> Etape de la technique ELISA	<b>26</b>
<b>Figure 10:</b> Résultat du test EITB	<b>27</b>
<b>Figure 11:</b> Résultats des tests de mise au point de l'ELISA-CS50 pour la détection des anticorps (IgG) de porcs dirigés contre les glycoprotéines de <i>T. solium</i>	<b>31</b>
<b>Figure 12:</b> Identification des protéines recombinantes T8, T14, T18 et MBP après migration sur gel SDS-PAGE (en présence de DTT) et coloration au bleu de Coomassie	<b>33</b>
<b>Figure 13:</b> Analyse par ELISA de l'antigénicité des protéines recombinantes T8, T18 et T14	<b>34</b>

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

La cysticerose est une infection parasitaire liée à la présence chez l'homme ou le porc, de la forme larvaire de *Taenia solium* (plathelminthe ou ver solitaire) appelée *Cysticercus cellulosae* (Michel *et al.*, 1990). C'est une zoonose liée au manque d'hygiène, au péril fécal et à l'élevage des porcs en divagation. Elle se contracte lors de l'ingestion d'œufs de *T. solium* contaminant les aliments et l'eau, ou par auto-infestation par les mains sales (Andriatsimahavandy *et al.*, 2003). Chez l'homme, l'expression clinique de cette maladie dépend du nombre et du stade de développement des cysticerques ainsi que de la localisation des parasites (Bronstein *et al.*, 2005 ; Patel, 2006). A Madagascar, une étude menée par les équipes de l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) en 2003, a montré une prévalence nationale de la cysticerose humaine active de l'ordre de 10%, indiquant une forte endémicité et plaçant ainsi Madagascar parmi les pays les plus touchés dans le monde (Andriatsimahavandy *et al.*, 2003). Elle est responsable d'environ 25% des cas d'épilepsie dans la Grande île et coûte 360 millions € / an pour le secteur de la santé publique (Rakotondrazaka *et al.*, 2003). Pour le porc, elle est la cause majeure de perte de revenus pour les éleveurs car elle fait baisser de 20% à 50% le prix de la viande infestée (Rasamoelina-Andriamanivo *et al.*, 2013; Praet *et al.*, 2010). De surcroît, la cysticerose porcine est la première cause de saisie de viande (qui peut atteindre environ 17% des porcs infectés) dans les petites tueries villageoises et constitue un facteur de propagation de la cysticerose humaine. Les données récentes obtenues à Madagascar estiment à environ 21% la prévalence de la cysticerose porcine (Porphyre *et al.*, 2015).

La cysticerose constitue une priorité de santé publique à Madagascar, du fait de sa forte prévalence, du coût de sa prise en charge et de son impact économique et en terme de sécurité alimentaire sur l'élevage porcin.. Chez le porc, les cysticerques peuvent être diagnostiqués sur l'animal vivant par palpation de la langue (Gonzalez, 1990). Cependant, cette technique très spécifique mais peu sensible, ne permet qu'une détection des animaux massivement infectés et son efficacité dépend de l'expérience de l'explorateur (Phiri *et al.*, 2006).

A l'heure actuelle, l'ELISA (ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) et le Western Blot (ou EITB : Electro Immuno Transfert Blot) restent les principales techniques sérologiques pour le diagnostic de la cysticerose humaine.

Ces techniques sérologiques actuellement disponibles et classiquement utilisées pour le diagnostic de la cysticercose (ELISA, EITB) nécessitent qu'elles soient réalisées en laboratoire car elles requièrent du personnel compétent ainsi que des équipements, des réactifs et des consommables spécifiques. Ceci constitue un frein pour : (1) le déploiement d'un test de diagnostic performant et utilisable directement par le personnel des centres de soin en zones rurales ou par les services vétérinaires en abattoirs/élevages et (2) la mise en place de stratégie efficace de lutte contre cette pathologie. Par conséquent, le développement de test de diagnostic de la cysticercose de type « Point-Of-Care », utilisable dans ces zones rurales où le risque de contamination est le plus élevé serait d'un apport précieux pour renforcer le diagnostic et la prise en charge de la cysticercose humaine et porcine et contribuerait valablement à l'interruption de la transmission porc-homme.

Les gènes codant les 7 glycoprotéines antigéniques (GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14, GP13) spécifiquement associés à la cysticercose humaine et Porcine ont été caractérisées et séquencés. Ce qui offre la possibilité de les synthétiser sous forme de protéines recombinantes afin de pallier au problème de disponibilité des cysticercs frais extraits de porcs infectés (Hancock *et al.*, 2003 et 2004; Greene *et al.*, 2000).

Ce travail a **pour objectif de développer un test sérologique pour le diagnostic de la cysticercose porcine**. L'étude est divisée en quatre grandes parties, la première partie est consacrée aux généralités sur la cysticercose, la deuxième décrit la méthodologie, la troisième rapporte les résultats ainsi que les interprétations. La dernière partie est constituée par la discussion suivie de la conclusion et des perspectives.

# **GENERALITES**

## SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. GENERALITES SUR LA CYSTICERCOSE

#### A. Le parasite : *Taenia solium*

##### 1. Classification

Embranchement : PLATHELMINTHES

Classe : CESTODES

Sous-classe : EUCESTODES

Ordre : CYCLOPHYLLIDAE

Famille : TAENIDAE

Les TAENIDAE sont caractérisées par des parasites dont les crochets ont trois éléments constitutifs : le manche, la lame et la garde (Rajaoarifetra, 2003).

Actuellement, sur les 42 espèces recensées au sein du genre *Taenia*, 3 espèces (*T. solium*, *T. saginata* et *T. asiatica*) sont connus comme ayant pour hôte définitif l'Homme (Nakao *et al.*, 2010).

##### 2. Stade de développement

Dans son cycle biologique et au cours de son développement, *Taenia solium* passe par 3 formes distinctes : le ver adulte, les œufs et la forme larvaire appelée cysticerque (figure1 A, B, C).

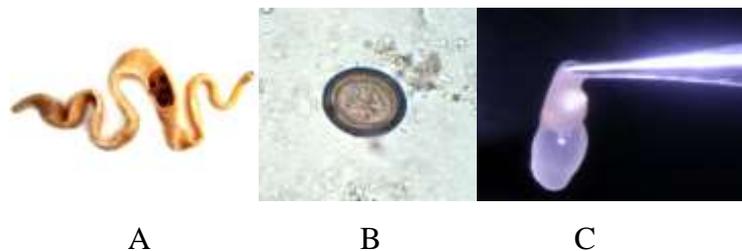
##### a. Etat adulte

*Taenia solium*, encore appelé *Taenia curbitanapallas*, est un parasite strictement humain se développant dans l'intestin grêle. C'est un ver plat dont le corps segmenté se divise en trois grandes parties : scolex, cou, et strobile (corps). Le scolex ou tête agit comme un dispositif de fixation avec quatre ventouses arrondies, un rostre court muni d'une double couronne de crochets utilisés pour se joindre à l'intestin de l'hôte. Ainsi, par la présence de ces crochets, on lui donne le nom « ténia armé ». A la suite du scolex, on trouve le cou qui est une région fine, courte et non segmentée entre la tête et le strobile. Ce dernier occupe la majeure partie des systèmes du ténia, il se compose de plusieurs segments appelés « proglottis ». Chaque segment renferme un appareil reproducteur hermaphrodite dont la maturation se fait progressivement le long du strobile, d'avant en arrière (Baer, *Universalis*). Comme tous les autres Cestodes, *T. solium* ne dispose pas d'un système digestif mais il utilise ses téguments

pour absorber les nutriments à partir de l'hôte qu'il infecte. C'est un ver solitaire pouvant atteindre une longueur comprise entre 2 à 7m (Peters et Gilles, 1982) et dont la durée de vie pourrait dépasser 10 ans pour l'adulte (Université médicale virtuelle Francophone).

#### b. Œufs

A maturité, les proglottis contenant des milliers d'œufs entièrement infectieux, sont émis passivement dans le milieu extérieur avec les selles humaines. Dans la nature, ces œufs sont trouvés sous formes isolées ou en chaînes plus ou moins longues. L'œuf est constitué d'une membrane vitelline, fragile, épaisse et translucide renfermant des granules réfringents délimitant l'œuf proprement dit. Une membrane interne brun sombre, radiée, résistante délimitant un embryophore de forme ovale mesurant 40 à 50µm sur 30µm. L'embryon présente à sa surface six petits crochets lui donnant le nom d'embryon "hexacanthé". Avant l'élucidation de la relation existant entre les ténias et leurs cysticerques, on a considéré les larves de ce parasite comme des espèces à part entière. Ainsi, la larve a été dénommée *Cysticercus cellulosae* (Acha *et al.*, 2005). Les différents stades du parasite sont présentés par la figure ci-dessous.



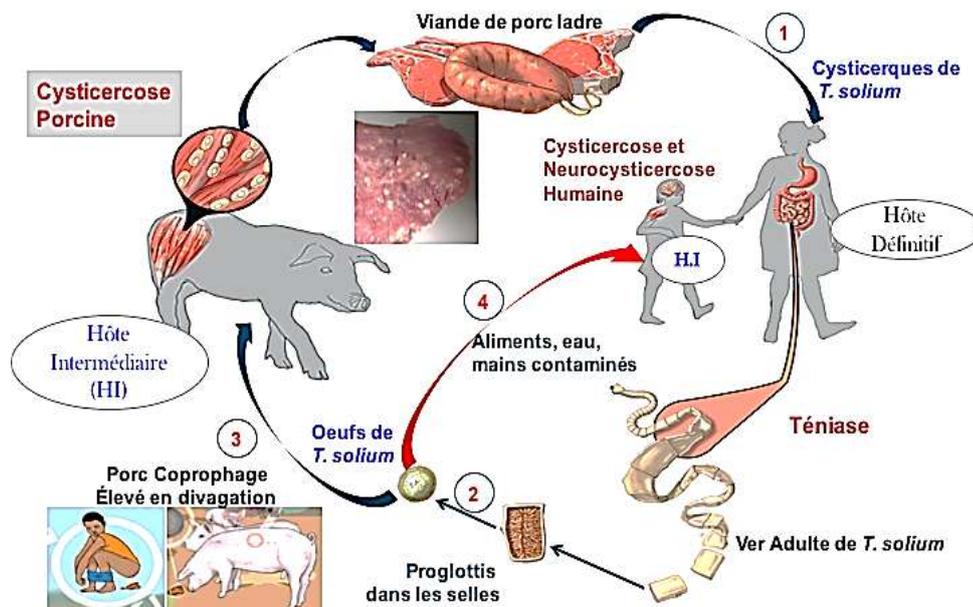
**Figure 1** : Parasite *Taenia solium* : Ver adulte (A), œufs (B), cysticerque (C).

Source : DPDx Parasite Image Library, Center for Disease Control & Prevention (CDC), USA. ([www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cysticercosis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cysticercosis.htm) 27): images A, B; Unité d'Immunologie, Institut Pasteur de Madagascar : image C.

### 3. Cycle de vie de *Ténia solium*

Le cycle de vie de *T. solium* comporte deux hôtes : un hôte définitif (l'homme) qui héberge la forme adulte et un hôte intermédiaire (le porc) qui abrite la forme larvaire. L'homme parasité joue un rôle majeur dans la dissémination du parasite car il élimine dans ses selles entre 5 à 6 anneaux gravidés par jour, anneaux contenant

chacun 30.000 à 50.000 œufs (Garcia *et al.*, 2005). L'embryon directement infestant, est capable de rester viable plusieurs mois à l'intérieur de ces œufs, résistant à l'eau mais pas à la sécheresse. Les porcs de nature coprophage s'infectent alors en ingérant des proglottis gravides ou des œufs contenus dans les excréments humains. Une fois ingérés par l'hôte intermédiaire, les embryons vont franchir la muqueuse de l'estomac ou la paroi intestinale, se propager par voie sanguine et se loger dans les muscles squelettiques, les yeux ou le cerveau. Ces œufs se développent et forment au bout de 3 à 4 mois, des kystes contenant chacun une larve de cysticerque appelée *Cysticercus cellulosea*. Lorsque l'homme mange de la viande de porc ladre insuffisamment cuite, le cysticerque libéré au cours de la digestion va se fixer sur la paroi intestinale et croître rapidement pour devenir un ténia adulte qui commence à émettre des œufs après quelques semaines (Golvan, *Universalis*). L'homme étant l'hôte définitif du cycle parasitaire de *T. solium*, il développe ainsi une "Taeniose" qui est une infection intestinale souvent asymptomatique causée par le ver adulte. En revanche, à la place du porc, l'homme peut aussi être l'hôte intermédiaire et développer accidentellement une cysticercose humaine. Dans ce cas, l'infestation est provoquée par l'ingestion des œufs de *T. solium* souillant les aliments ou présents sur les mains sales du sujet lui-même. Cette étape représente ainsi l'impasse parasitaire du cycle. La figure suivante résume le cycle de développement du parasite.



**Figure 2 :** Cycle de vie et de transmission du parasite *Taenia solium* (Adapté de Rasamoelina-Andriamanivo *et al.*, 2013). Sources : Antso Andrianary, FSP/PARRUR : Images du garçon et du porc avec la selle humaine, Unité d' Immunologie, IPM : Photo de la viande ladre.

## B. REPARTITION GEOGRAPHIQUE ET EPIDEMIOLOGIE

### 1. Répartition mondiale

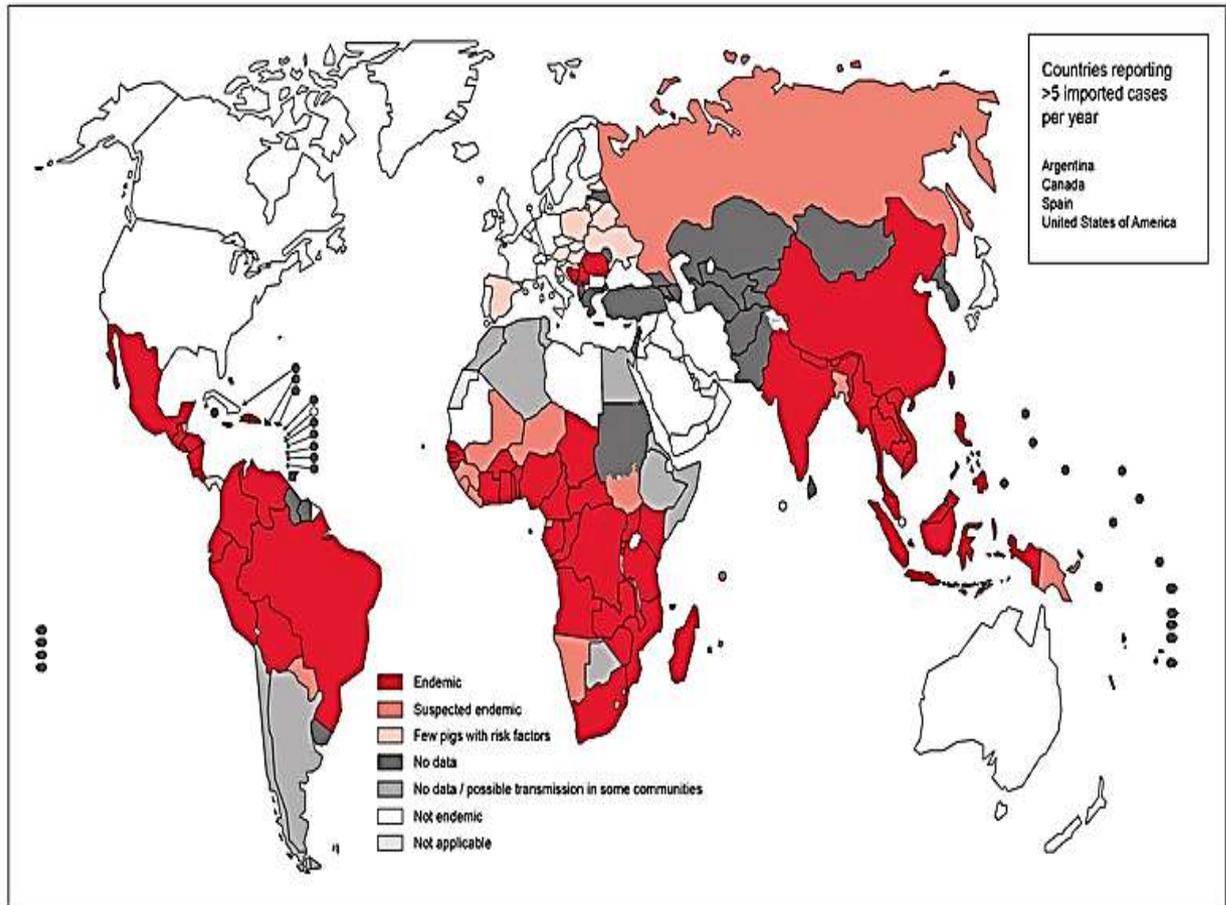
La cysticerose est une zoonose cosmopolite et endémique dans de nombreux pays. Elle affecte particulièrement les régions rurales d'élevage intensif où les conditions d'hygiène sont défectueuses, les installations sanitaires rares, la consommation de viande ou les préparations à base de porc sont fréquentes et où la promiscuité homme-animal est très importante (Raether *et al.*, 2003; Sciutto *et al.*, 2000). Les foyers endémiques rapportés par l'OMS sont : l'Amérique centrale et du Sud (région des Andes, Brésil, Mexique, Amérique centrale), l'Asie (Chine, Inde, Papouasie, Nouvelle Guinée, Sud-est de l'Asie), et l'Afrique subsaharienne.

La cysticerose est un problème connu de longue date en Amérique latine. De nombreuses études de prévalence humaine ont été faites et rapportant une séroprévalence moyenne élevée de l'ordre de 10% et une prévalence de la neurocysticerose variant de 1 à 22% (Pawlowski *et al.*, 2005). Le taux de prévalence de la cysticerose porcine est extrêmement variable selon les régions (moins de 2% à plus de 75%) (Flisser *et al.*, 2003).

La cysticerose est un problème émergent de santé publique dans la quasi-totalité de l'Afrique Sub-Saharienne excepté dans les régions musulmanes ou les régions où le porc est très peu consommé. L'Afrique fait partie des continents le plus touché dans le monde. Au Burundi, au Cameroun, en Côte d'Ivoire, à Madagascar, au Sénégal, au Togo, au Zimbabwe, au Bénin et à l'île de la Réunion, la prévalence de la cysticerose humaine a été estimée entre 0,45 et 30% (Avode D.G., 1996).

Dans les pays développés, la cysticerose a été presque éradiquée mais sa réapparition est due à une immigration accrue dans des zones endémies. En Europe, la majorité des cas importés provenaient d'Amérique latine (Bouteille, 2014; Laranjo-González *et al.*, 2017). Aux Etats-Unis, la réémergence de *T. solium* a eu lieu dans les années quatre-vingt-dix quand plusieurs cas ont été décrits dans une communauté juive Orthodoxe où la religion interdit la consommation de porc. La séroprévalence était de 1,3% (Moore *et al.*, 1995).

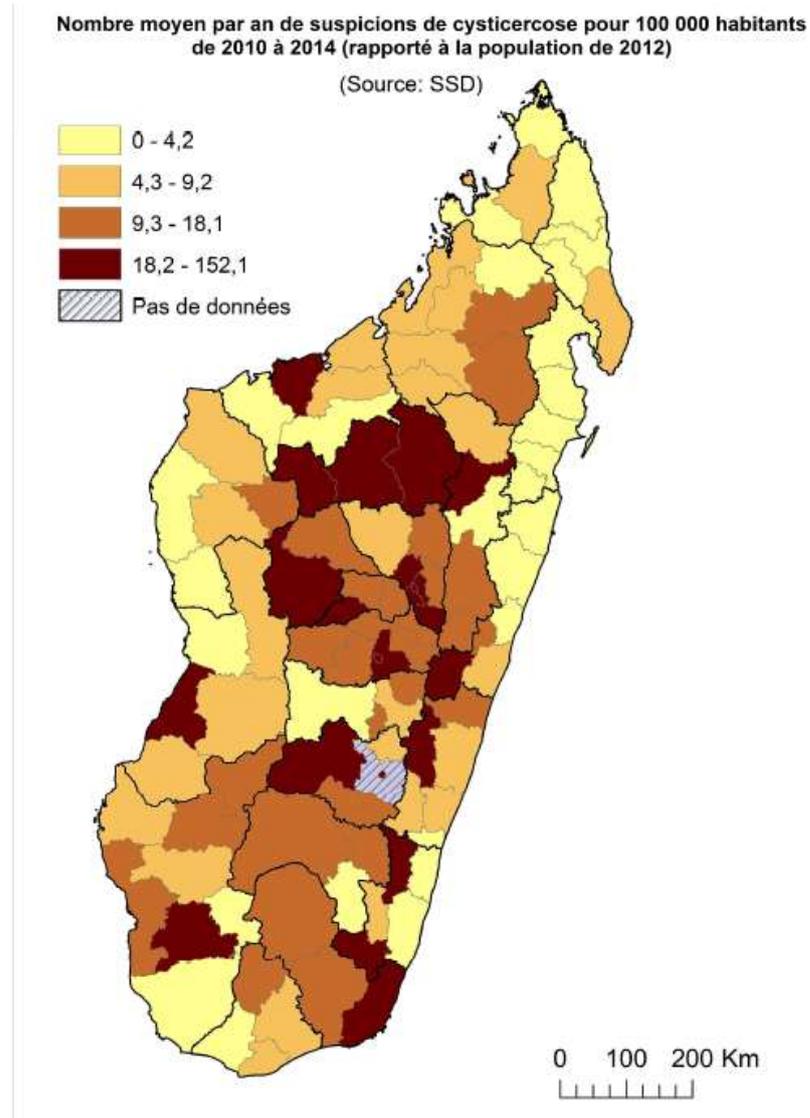
La figure 3 montre la distribution mondiale de la cysticerose selon l'OMS (2015).



**Figure 3** : Répartition mondiale des zones endémiques pour *T. solium* (OMS, 2015) : ([http://www.who.int/taeniasis/Endemicity-Taenia\\_Solium\\_2015.jpg?ua=1](http://www.who.int/taeniasis/Endemicity-Taenia_Solium_2015.jpg?ua=1)) [Nash & Garcia, 2011].

## 2. Répartition à Madagascar

A Madagascar, la séroprévalence de la cysticerose humaine active est estimée entre 7 et 21% (moyenne 16%). Ces données indiquent une endémicité de haut niveau et place Madagascar parmi les pays les plus touchés (L'OMS définit comme zone endémique à la cysticerose les régions avec une prévalence supérieure à 10%). Les enquêtes menées au niveau national en 2015-2016 par le Ministère de la Santé Publique montraient que 54 districts (sur 114 districts) sont présumés endémiques à la Téniasse. Toutefois, les pathologies liées à *T. solium* semblent touchées l'ensemble du pays comme le montre les données sur les suspicions de cas de cysticerose humaine notifiées par les Services de Santé de District – SSD entre 2010 et 2014 (Figure 4).



**Figure 4 :** Distribution de la cysticerose humaine à Madagascar : nombre de suspicions de cas de cysticerose humaine pour 100 000 habitants (Service de Santé de District, SSD-RMA).

La prévalence de la cysticerose humaine est très hétérogène sur la Grande Île : elle est inférieure à 10% dans les zones côtières (Mahajanga et Toamasina) et plus élevée dans les régions centrales (Antananarivo, Fianarantsoa, Ambositra, Mahasolo), où l'élevage de porcs est plus important (Andriatsimahavandy *et al.*, 2003).

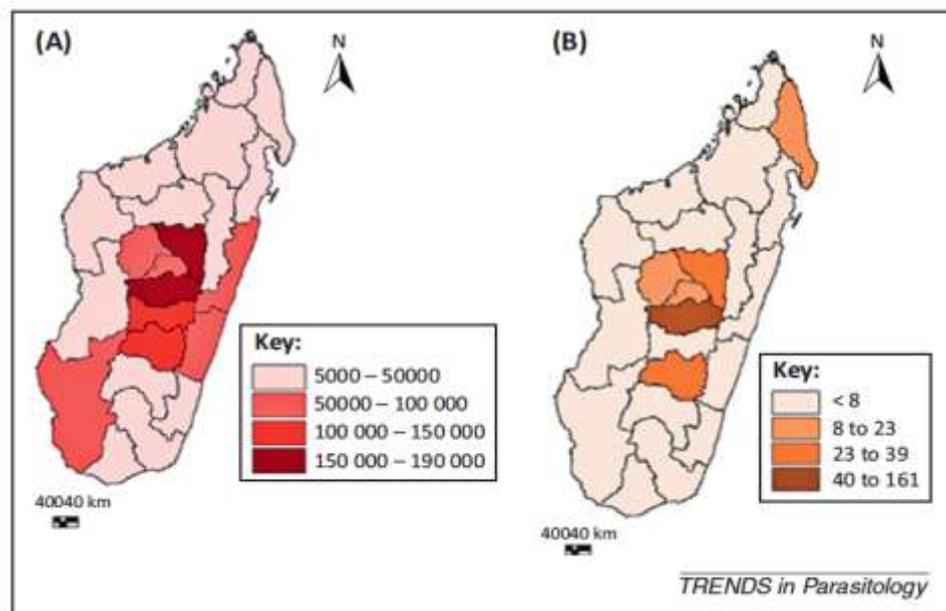
### C. LA CYSTICERCOSE PORCINE

Communément appelée ladrerie (« voavary » grain de riz en langue malagasy), la cysticercose porcine a été décrite pour la première fois à Madagascar en 1901 (Andrianjafy, 1910; Monnier et Andrianjafy, 1910). Sa transmission est étroitement liée au péril fécal avec des porcs élevés généralement en divagation et ayant accès à des matières fécales humaines (Garcia *et al.*, 2003; Copado *et al.*, 2004). La prévalence de l'infestation à *T. solium* se superpose à la répartition géographique du Téniasis Humain (Michelet *et al.*, 2010) et varie selon le niveau de l'assainissement (latrines artisanales s'écoulant dans les rizières), les coutumes (défécation en plein air, ...), les pratiques d'élevage des porcs (animaux laissés en divagation) et des habitudes alimentaires de la région (viande insuffisamment cuite, charcuterie artisanale). L'augmentation de l'âge des porcs est un facteur de risque en cas d'exposition.

Dans la majorité des cas, la cysticercose porcine est asymptomatique. En tout début d'infestation, le porc présente une légère diarrhée due à l'irritation de la muqueuse intestinale. Une fois les cysticerques installés, des signes de myosite peuvent s'observer se traduisant par des troubles de locomotion ou de la mastication, une salivation excessive, des clignements des yeux plus fréquents accompagnés d'un excès de larmes et de nodules sous-conjonctivaux (Prasad *et al.*, 2006). Une encéphalite et même des crises épileptiques sont décrites lorsque les cysticerques se localisent au niveau de l'encéphale. La mort peut survenir subitement lors d'une infestation massive du cœur. Le diagnostic de la cysticercose porcine est un élément important pour déterminer la situation endémique d'un pays et élaborer les stratégies de lutte contre la cysticercose.

Avec plus 1 300 000 porcs répartis dans plus de 500 000 élevages, le cheptel porcin de Madagascar est le septième en Afrique (FAOSTAT, 2010), mais la plupart des éleveurs sont des petits exploitants (avec une moyenne de 2,4 porcs par élevage). Environ 70% des élevages de porcs sont concentrés dans les Hauts Plateaux centraux (MAEP, 2007; Ministère de l'Agriculture, 2004-2005; Rasamoelina-Andriamanivo *et al.*, 2013). La cysticercose porcine est la cause majeure de perte de revenus des éleveurs parce qu'elle fait baisser de 20% à 50% le prix de la viande infestée (Rasamoelina-Andriamanivo *et al.*, 2013; Praet *et al.*, 2010). Les rapports mensuels d'inspection des viandes de la Direction des Services Vétérinaires (DSV) en 2007

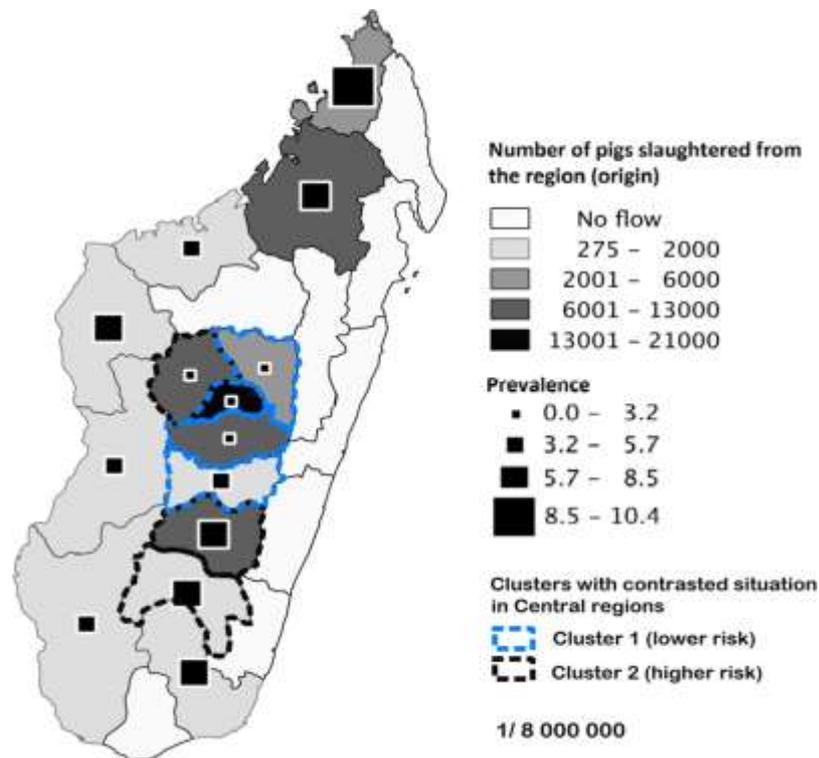
rapportent une prévalence de 5,5% de la cysticerose porcine avec une importante disparité régionale. Les résultats de cette enquête nationale montrent que 336 élevages avec des porcs infectés par des cysticerques de *T. solium* ont été observés sur les Hautes Terres Centrales de Madagascar avec une prévalence de 48% dans la région de Vakinakaratra, 12% en Haute Matsiatra, 10% en Analamanga, et 7% dans la région de Bongolava (Rasamoelina *et al.*, 2013). La Figure 5 montre la distribution du cheptel porcin et des cas de cysticercozes porcines observés dans la Grande Ile entre 2001 et 2011.



**Figure 5 :** Distribution du cheptel porcin et des cas de cysticerose porcine à Madagascar. (A) : carte de la distribution du cheptel porcin (nombres de porcs). (B) : distribution des cas de cysticerose porcine rapportés entre 2001-2011. Données de l'Unité d'épidémiologie du FOFIFA / Direction de la Recherche Zootechniques et Vétérinaires de Madagascar (Rasamoelina *et al.*, 2013).

Une étude récente, menée par Porphyre et ses collaborateurs en 2015, a mis en évidence une forte prévalence (21%) de la cysticerose porcine chez les porcs abattus dans 2 abattoirs d'Antananarivo (Anosizato et Ankadintratombo) (Porphyre *et al.*, 2015). L'examen global de plus de 68 000 carcasses de porc a permis d'estimer la prévalence nationale apparente à 4.6%. Celle-ci a été corrigée pour prendre en compte les erreurs possibles de l'inspection visuelle des carcasses et atteignait ainsi une prévalence estimative de 21%. Les animaux provenaient de 79 communes réparties dans 36 districts appartenant aux 14 régions (sur un total de 22 régions administratives) de Madagascar. Certaines régions ont été identifiées comme zones

de production à risque pour le marché final dans la capitale Malgache : la prévalence estimée la plus élevée (7,1% [5,9-8,4%]) a été trouvée dans la région d'Ihorombe autour de la Ville de Fianarantsoa (Voir Figure 6).



**Figure 6 :** Prévalence de la cysticerose porcine basée sur la détection de lésions dues aux cysticerques de *T. solium* lors de l'inspection post-mortem de 68 432 porcs abattus dans 2 abattoirs urbains à Antananarivo (Madagascar) de mars 2013 à février 2014. La taille des carrés noirs est proportionnelle à la prévalence de la cysticerose, tandis que la dégradation de la coloration des régions indique le nombre de porcs abattus selon leur région d'origine. Les lignes pointillées identifient les zones présentant un risque faible (bleu) et élevé (noir) pour la cysticerose porcine pour les régions centrales de Madagascar. (Porphyre *et al.*, 2015)

Ces données ont montré que : (1) la cysticerose porcine constitue un véritable problème de Santé Alimentaire avec des répercussions importantes au niveau économique mais aussi et surtout sur la Santé Humaine à Madagascar (Porphyre *et al.*, 2016) et laissent à conclure que (2) les moyens de diagnostics actuellement utilisés pour détecter les porcs infectés sont à améliorer.

## D. MOYENS DE DIAGNOSTIC DE LA CYSTICERCOSE PORCINE

### 1. Examen de la langue ou languoyage

L'inspection de la langue constitue la seule technique classiquement utilisée sur le terrain pour la détection de la cysticerose porcine avant l'abattage. Cette méthode

consiste à palper et à explorer la face ventrale de la langue de l'animal à la recherche des cysticerques (Gonzalez, 1990). Le languageage est un moyen de diagnostic facile à mettre en œuvre (même au niveau des éleveurs) mais la sensibilité reste faible malgré une spécificité élevée. Des études ont montré une sensibilité allant de 16,1% à 100% lorsque l'animal est fortement infesté (Dorny *et al.*, 2004). Les cysticerques sont palpables dès la 2<sup>ème</sup> semaine après l'infestation puis visibles à l'œil nu à partir de la 6<sup>ème</sup> semaine sous une forme ovale.

La technique de palpation de la langue s'avère être la plus pratique mais elle ne permet qu'une détection des animaux massivement infestés et son efficacité dépend de l'expérience de l'explorateur (Phiri *et al.*, 2006). Cependant, elle est couramment employée par les éleveurs et les vétérinaires pour identifier les porcs malades parce qu'elle est facilement réalisable et moins coûteuse que les autres moyens de diagnostic.

## 2. Inspection des viandes

L'inspection des viandes (carcasses) dans les abattoirs consiste en la recherche des kystes dans les muscles et les viscères après l'abattage de l'animal. En raison de leurs habitudes coprophages, les porcs sont souvent massivement infestés par les cysticerques dans toutes les parties du corps. Ainsi l'incision se fait dans les masséters, la langue, le diaphragme, le cœur et les muscles striés pour la recherche des cysticerques viables. Cette méthode a une sensibilité de 38,7% et une spécificité de 100% (Dorny *et al.*, 2004).

Malgré leur haute spécificité, les méthodes de languageage et d'inspection des carcasses constituent un moyen de diagnostic un peu tardif. De surcroît, la prévalence de la cysticercose porcine est souvent sous-estimée avec ces deux méthodes. Le développement d'autres moyens de diagnostic s'avèrent donc nécessaires pour renforcer (1) le diagnostic précoce de la cysticercose porcine et (2) le contrôle de la maladie.

## 3. Diagnostic sérologique

Plusieurs techniques ont été décrites pour détecter les anticorps (Ac) ou les antigènes (Ag) dues aux infections par *T. solium* chez l'homme et chez les porcs, telles que la

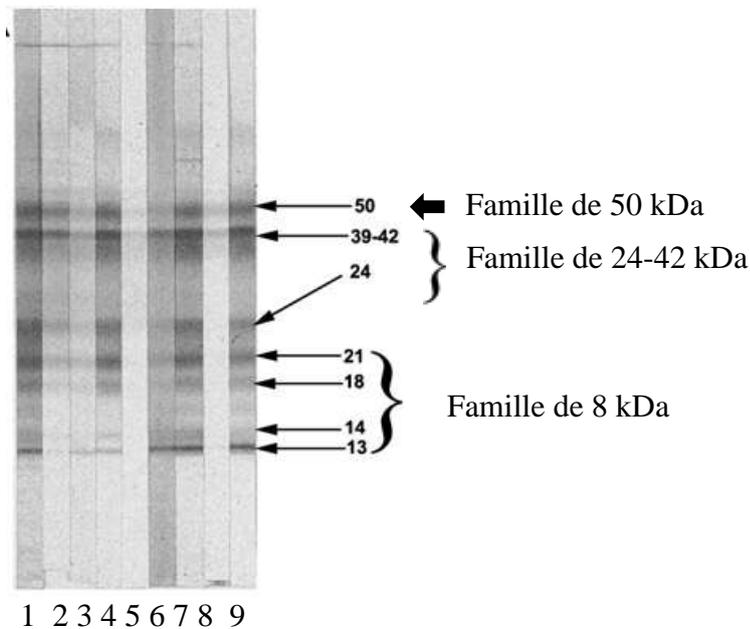
radio-immunologie, l'hémagglutination, le dosage immuno-enzymatique (ELISA) et les techniques d'Immuno-transfert blot (EITB) (Deckers *et al.*, 2010). La sérologie sanguine à la recherche d'anticorps dirigées contre les antigènes de *T. solium* par ELISA et/ou par EITB est largement recommandée dans les pays endémiques pour orienter le diagnostic en cas de suspicion de cysticerose ou neurocysticerose Humaine et dans certains cas de cysticerose porcine. L'ELISA reste la méthode la plus simple à réaliser et la moins coûteuse mais avec une spécificité plus faible comparée à l'EITB qui constitue la technique sérologique de référence. Certains de ces techniques de sérodiagnostic développées pour l'Homme ont été adaptés et validés chez le porc pour la détection de la cysticerose porcine. Toutefois, leur utilisation chez le porc reste limitée dans le cadre des projets de recherche.

a. Détection des anticorps anti- *T. solium*

A l'heure actuelle, l'ELISA et le Western Blot (EITB), utilisant des glycoprotéines totales de cysticerques de *T. solium*, développés par Tsang et collaborateurs en 1989, restent les principales techniques sérologiques pour la détection d'anticorps anti-*T. solium* chez l'Homme. Ces deux techniques sont basées sur l'utilisation d'une fraction glycosylée extraite des membranes de cysticerques de *T. solium* et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de lectine de lentilles (Tsang *et al.*, 1989).

L'ELISA est le test quantitatif de détection d'anticorps le plus utilisé pour le diagnostic de la cysticerose du fait de sa simplicité et de son coût abordable. La purification de la fraction de glycoprotéines développée par Tsang *et al.* est également utilisée en ELISA pour la détection des anticorps de type IgG aussi bien chez l'Homme que chez le porc. D'autres techniques d'ELISA détectant la présence des anticorps anti-*T. solium* chez l'humain ont été également développées. Certaines sont disponibles sur le marché sous forme de kit commerciaux telles que l'ELISA utilisant des peptides oncosphériques (Ferrer *et al.*, 2005) ou celui utilisant des extraits bruts d'antigènes de *T. solium*, commercialisé par NovaTec (Diaz *et al.*, 1992). Chez le porc, l'antigène à 14 kDa a été isolé du liquide de cysticerques de *T. solium* par HPLC et évalué en ELISA pour le diagnostic de la cysticerose porcine (Assana *et al.*, 2006).

L'EITB qui est le test qualitatif permet d'analyser les réactivités immunologiques (anticorps sériques ou contenus dans le Liquide Céphalo-Rachidien) spécifiquement dirigées contre 7 glycoprotéines (GP) antigéniques extraites des cysticerques de *T. solium* et nommées GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14, GP13 (les chiffres correspondent à la masse moléculaire des glycoprotéines en kilodaltons, kDa). En utilisant l'EITB, un profil de reconnaissance montrant une réactivité contre les glycoprotéines à 13/14 kDa a été identifié comme spécifiquement associées à la cysticerose/neurocysticerose active humaine (Tsang *et al.*, 1989 ; Andriatsimahavandy *et al.*, 2003; Scheel *et al.*, 2005). L'EITB-LLGP de Tsang qui figure dans la liste des tests sérologiques proposée par l'OMS est également utilisé pour le diagnostic de la cysticerose porcine (Gonzalez *et al.*, 1990).



**Figure 7 :** Diagnostic sérologique de la cysticerose/neurocysticerose par la technique d'EITB (Western Blot). Réactivités immunologiques (anticorps de type IgG) spécifiquement dirigées contre 7 glycoprotéines (GP) antigéniques extraites des cysticerques de *T. solium* : GP50, GP42-39, GP24, GP21, GP18, GP14, GP13 (les chiffres correspondent à la masse moléculaire des glycoprotéines en kilodaltons, kDa). Chacune des 9 bandelettes d'EITB a été analysée en utilisant des sérums de patients atteints de neurocysticerose (Adapté de Schell *et al.*, 2005).

Ces 7 glycoprotéines membranaires antigéniques et observables par EITB ont montré des différences structurales et fonctionnelles et ont été groupées en 3 familles de protéines nommées : i) Famille des 50kDa (comprenant l'antigène GP50 seul), ii)

Famille des 24-42kDa (incluant les antigènes GP42-39 et GP24), et iii) Famille des 8 kDa (regroupant les antigènes GP21, GP18, GP14, GP13) (Hancock *et al.*, 2003, 2004, 2006 ; Rodriguez *et al.*, 2012). En plus de l'EITB-LLGP utilisant les protéines antigéniques natives, l'EITB basé sur l'utilisation de la protéine antigénique recombinante correspondant à la GP24 (Hancock *et al.*, 2006; Noh *et al.*, 2014) est également mentionné dans la liste des tests de diagnostic proposée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 2015).

L'EITB est classé comme la meilleure méthode de diagnostic de la cysticercose porcine, elle présente une sensibilité et spécificité élevée (Gonzalez *et al.*, 1990; Tsang *et al.*, 1991). Elle permet de différencier l'infection précoce de l'infection tardive. Une étude faite par Aluja *et al.*, 1996 a démontré que l'apparition des bandes de 13,14, et 18 kDa jusqu'au 92<sup>ème</sup> jours est signe d'une infection récente, à ce stade le taux d'anticorps détecté par la méthode ELISA est aussi élevé. Par contre, la détection des glycoprotéines de 24, 42 et 50 kDa sont liées à une infection tardive et après 92 jours le taux d'anticorps sérique diminue.

#### b. Détection des antigènes circulants de *T. solium* par technique ELISA

L'ELISA-Antigène (Ag-ELISA) est une technique d'ELISA développée pour la détection d'antigènes (Ag) circulants de cysticercose en utilisant des anticorps monoclonaux (Brandt *et al.*, 1992). C'est une méthode de diagnostic importante qui indique la présence de parasites viables. La réactivité obtenue au cours des tests d'Ag-ELISA est généralement proportionnelle à la taille des lésions et au nombre de cysticercs viables. Un test positif est fortement indicateur d'une cysticercose active multi-kystique. Ce test sérologique peut ainsi constituer un outil de suivi sérologique de traitement antiparasitaire chez l'humain ou le porc car les taux d'antigène diminuent rapidement après un traitement anthelminthique (Deckers et Dorny, 2010).

A l'heure actuelle, les Ag-ELISA utilisant des anticorps monoclonaux HP10 (Harrison *et al.*, 1989) ou B158/B60 commercialisé par ApDia (Dorny *et al.*, 2004) pour rechercher les antigènes de *T. solium* chez l'humain et chez le porc sont les plus utilisés et mentionnés dans la liste des tests de diagnostic proposée par l'OMS en 2015.

Le test commercial basé sur la détection des antigènes utilisant les anticorps monoclonaux B158/B60 a montré une sensibilité et une spécificité de 85% et de 92% respectivement chez l'Humain. Chez le porc, la sensibilité et la spécificité du test sont respectivement de 86,7% et de 94,7% (Garcia *et al.*, 2000). Même avec l'avantage d'identifier les porteurs d'infection active (Nguekam *et al.*, 2003; Erhart *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2000), ce test est toutefois spécifique du genre mais ne permettant pas de différencier les infections dues à différentes espèces de *Taenia* chez les porcs (*T. solium*, *T. hydatigena*, *T. asiatica*) (Rodiguez-Hidalgo *et al.*, 2006; Dorny *et al.*, 2004). Chez les porcs infectés expérimentalement, les antigènes circulants sont détectés entre 2 et 6 semaines après l'infection et restent présent généralement tout au long d'une période d'observation de 6 mois, même chez les porcs porteurs de seulement cinq à huit kystes vivants.

Le sérodiagnostic est très important pour le contrôle et la prise en charge de la cysticercose humaine et porcine. Toutefois ces différentes techniques sérologiques se heurtent à des nombreux problèmes tels que la réactivité croisée des anticorps détectés, la spécificité des antigènes ainsi que les difficultés de mise en œuvre de ces techniques dans les pays endémiques. La sensibilité et la spécificité de tous ces tests sérologiques dépendent, de surcroit, de la densité des formes parasitaires, du site des lésions et de la réponse immunitaire de l'hôte.

En résumé, la cysticercose est une maladie tropicale négligée qui représente une contrainte économique importante pour la filière porcine et un grave problème de santé publique à Madagascar.

Le contrôle de la cysticercose est basé sur des actions de santé publique pour stopper la transmission, d'une part en supprimant la contamination humaine et d'autre part, en organisant la surveillance des infections chez les porcs (Gweba *et al.*, 2010; Mukaratirwa et Lekule 2008). L'homme porteur du Ténia adulte est le seul transmetteur de la cysticercose que ce soit à l'homme ou au porc. Les mesures de lutte contre cette pathologie doivent donc inclure :

- i) la lutte contre le péril fécal (éducation sanitaire, amélioration des systèmes de latrines, ...),

- ii) l'amélioration des pratiques d'élevages de la filière porcine (élevage en claustration, amélioration de l'alimentation, prophylaxie, hygiène et biosécurité, inspection des viandes) et
- iii) la réduction du réservoir de parasites (chez l'homme et chez le porc) en renforçant le diagnostic et le traitement des individus porteurs de *T. solium* et des porcs atteints de cysticerose.

Malgré leur simplicité apparente, la mise en œuvre de ces mesures est souvent difficile et leur efficacité est réduite. Le langage et l'inspection *post-mortem* des carcasses de porc sont les moyens de diagnostic les plus utilisés à Madagascar pour le diagnostic de la cysticerose porcine, mais leur faible sensibilité ne permet d'identifier qu'une très faible proportion des animaux malades.

Concernant les sérodiagnostics pour la détection des anticorps anti-*T. solium*, l'un de leur principal problème est leur dépendance à la collecte de parasites sur porc contaminé et la préparation périodique de nouveau lot d'antigènes. Ceci implique des variations possibles de la préparation antigénique produite dans le même laboratoire, et des variations certaines entre laboratoires. De surcroît, les moyens de diagnostic sérologique actuellement disponible pour la cysticerose sont coûteux et difficilement réalisables en zone d'endémies car ils nécessitent du matériel et des réactifs spécifiques ainsi qu'un personnel qualifié. Pour finir, les réactivités immunologiques détectées par EITB sont souvent difficiles à interpréter car le niveau de glycosylation des antigènes natifs peut jouer sur la netteté et la masse moléculaire apparente des bandes détectées.

Par conséquent, le développement de tests de diagnostic sérologiques basés sur l'emploi d'antigènes de *T. solium* produits sous forme de protéines recombinantes serait d'un apport précieux dans le diagnostic de la cysticerose à Madagascar. C'est dans ce cadre que projet Master s'inscrit et il est plus particulièrement axé sur l'utilisation de protéines recombinantes pour le sérodiagnostic de la cysticerose porcine. Ces tests, une fois développés et optimisés, contribueraient valablement à renforcer les stratégies de lutte contre la cysticerose et plus particulièrement à interrompre la transmission Porc-Homme de cette parasitose.

## E. OBJECTIFS DU TRAVAIL

Ces quinze dernières années, beaucoup d'efforts ont été déployés à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM) pour développer et valider des outils de diagnostic pour la cysticerose Humaine et Porcine. A l'heure actuelle, l'ELISA et le Western Blot (EITB) développés sur place et basés sur l'utilisation des glycoprotéines natives de cysticerques de *T. solium* (glycoprotéines extraites et purifiées selon la méthode de Tsang et ses collaborateurs en 1989) constituent les principales techniques sérologiques utilisées à l'IPM.

Un projet de production d'antigènes recombinants pour palier au problème de disponibilité des cysticerques prélevés sur de la viande de porc (pour extraire les glycoprotéines natives) a récemment été développé au sein de l'Unité d'Immunologie. Ce projet qui rentrait dans le cadre d'une thèse de doctorat ciblait les antigènes de 50, 24, 18, 13/14 et 8 kDa. Ces antigènes recombinants pourraient permettre de développer des outils de diagnostic sérologiques aussi performants que leur forme native. L'objectif final est de développer des tests de diagnostic de type « Point-Of-Care » pour détecter la cysticerose Humaine et porcine. Ces tests seraient utilisables directement au niveau des structures sanitaires (humaines et vétérinaires) voire même par les patients et éleveurs eux-mêmes afin d'analyser plus rapidement la présence d'anticorps anti- *T. solium* dans le sérum de porcs ou de patients infectés.

- **Objectif global**

Le présent travail s'inscrit dans un projet global de développement d'un test de diagnostic sérologique pour la détection d'anticorps dirigés contre *C. cellulosea* chez le porc et chez l'Homme en utilisant des protéines antigéniques recombinantes.

**L'objectif principal de mon projet de Master est d'évaluer l'intérêt diagnostique de trois antigènes de *T. solium* (correspondant aux glycoprotéines GP14, GP18 et GP8 natives), produits sous forme de protéines recombinantes solubles, pour le diagnostic de la cysticerose porcine.** Cette évaluation sera réalisée en utilisant la méthode ELISA et une banque des sérums de porcs atteints ou non de la cysticerose. La méthode de référence au cours de cette validation est le Western

Blot (EITB) basé sur l'utilisation d'un extrait de glycoprotéines totales natives de cysticerques de *T. solium* (appelé dans cette étude « CS50 »).

- **Objectifs spécifiques**

Les objectifs spécifiques de cette étude sont de :

1. Optimiser et adapter (temps de révélation, réactif de saturation, concentration d'antigène et d'anticorps secondaire) la méthode ELISA, utilisée en routine au Laboratoire pour un diagnostic de la cysticercose Humaine, au diagnostic de la cysticercose porcine. Cette méthode ELISA est basée sur l'utilisation de la CS50 testées avec une banque de sérums de porcs.
2. Evaluer par ELISA, l'antigénicité des trois antigènes de *T. solium* (correspondant aux GP14, GP18 et GP8 natives) produits sous forme de protéines recombinantes solubles avec des bio-banques de porcs préalablement diagnostiqués par langueyage, inspection des carcasses et la technique de référence en sérologie : le Western Blot sur CS50.
3. Etudier la sensibilité et la spécificité des tests "ELISA-porc" utilisant la CS50 et chacune des 3 protéines recombinantes.

# **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### I. METHODOLOGIE GLOBALE

Ce travail de Master est inclus dans le projet de recherche de l'Unité d'Immunologie des Maladies Infectieuses (IMI) visant à développer des tests de diagnostic sérologiques et moléculaire pour améliorer le diagnostic de la cysticerose Humaine et porcine à Madagascar.

Le travail réalisé durant ce Master a été effectué en suivant la méthodologie globale schématisée dans la Figure 8.

Les sérums de porcs (atteints ou non de la cysticerose) ont d'abord été testés par EITB-CS50 (tests de référence sérologique) en utilisant les glycoprotéines natives totales extraites et purifiées à partir de cysticerques de *T. solium* selon la méthode de Tsang *et al.*, 1989. La présence d'anticorps anti-*T. solium* (immunoglobulines de type G, IgG) dirigés contre les glycoprotéines contenues dans la CS50 ou dirigés contre chacune des 3 protéines recombinantes produites au sein de l'Unité a ensuite été analysée par ELISA.

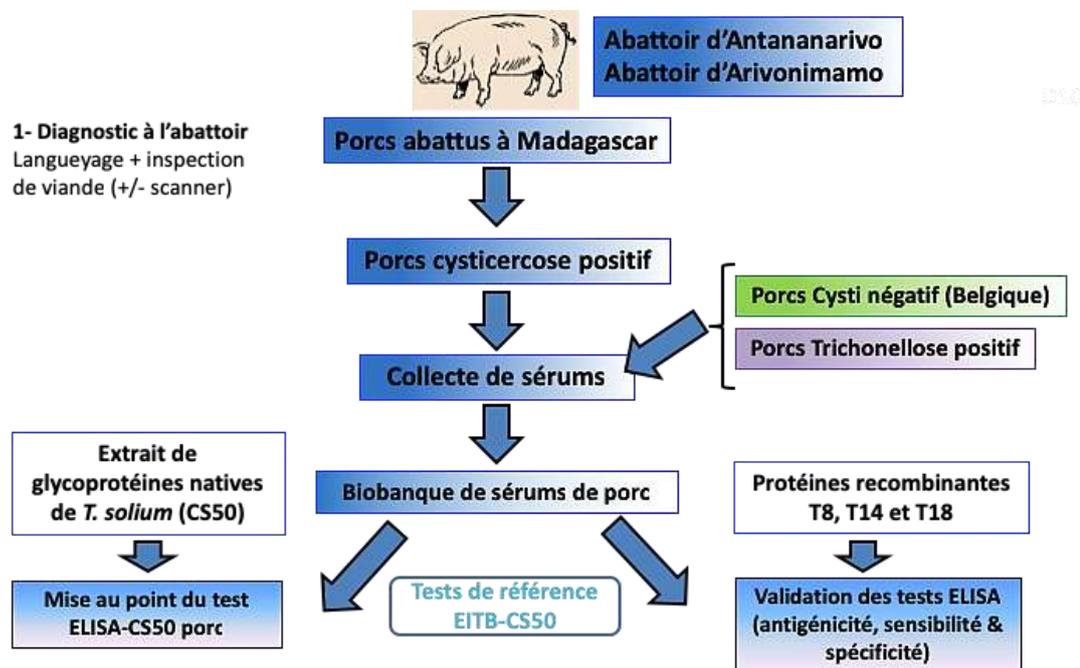


Figure 8 : Méthodologie globale du travail.

#### A. COLLECTION DE SERUMS DE PORCS

Afin de valider l'utilisation des protéines recombinantes produites comme marqueurs sérologiques, des campagnes de prélèvement de sérums de porcs atteints ou pas de

cysticercose ont été réalisées avec le Laboratoire National de Diagnostic Vétérinaire de Madagascar (LNDV) et avec le Département de biologie des maladies vétérinaires de l'Université de Copenhague - Danemark. D'autres sérums, provenant des porcs élevés à Madagascar ou provenant d'une zone non-endémique (Danemark) pour la cysticercose porcine, ont été également obtenus. Les résultats obtenus au cours de cette étude ont été générés à partir d'une collection de sérums de porcs constituée de:

- Douze sérums de porcs (appelés Cel1-Cel5, Cel8-Cel12, Cel14 et Cel15) provenant de l'abattoir d'Arivomamo (Région d'Itasy) et pré-diagnostiqué par les méthodes de langueyage et d'examen approfondis des carcasses ainsi que par l'utilisation d'un scanner portatif (Master de Céline LACROIX, IPM-2016)
- Onze sérums de porc (appelés LNDV) provenant des élevages à Madagascar et de deux abattoirs d'Antananarivo (Anosizato et Anosipatrana)
- Quarante sérums de porcs sains provenant de zones non-endémiques à la cysticercose (appelés Belg)
- Quatorze sérums de porcs atteints de la trichinellose (appelés Tric et Exuda)

Les tests de mise au point et de validation des techniques ELISA (utilisant la CS50 ou utilisant les protéines recombinantes) ont été réalisés en incluant systématiquement des sérums de porcs provenant de l'abattoir d'Anosizato et préalablement testés et identifiés au laboratoire comme témoins négatifs et témoins positifs.

a. **Le témoin négatif** : il s'agit d'un sérum de porc totalement exempt de cysticerques de *T. solium* (après examen minutieux de la carcasse) et testé négativement avec la méthode de référence EITB-CS50.

b. **Le témoin positif**: c'est un sérum de porc atteint de cysticercose détectés après langueyage et inspection des différents organes (cysticerques présents dans l'échine et les membres) et analysé positivement par EITB-CS50.

## B. ANTIGENES DE *T. solium*

Les antigènes utilisés dans les tests sérologiques (ELISA et EITB/Western Blot) au cours de cette étude sont constitués par :

- La fraction totale de glycoprotéines membranaires de cysticerques de *T. solium* extraite et purifiée selon la méthode de Tsang *et al.*, 1989.

- Les antigènes recombinants de *T. solium* (rGP18, rGP14 et rGP8) correspondant respectivement aux glycoprotéines natives T18, T14 et T8 et produits sous forme solubles en utilisant un système de production de protéine recombinante chez la bactérie (*E. coli*).

#### 1. Antigènes membranaires de cysticerques de *T. solium* (CS50)

La CS50 est une fraction glycoprotéique totale issue de la purification d'un extrait protéique de cysticerques prélevés sur porcs ladres selon le protocole initialement décrit par Tsang *et al.*, 1989. Brièvement, les cysticerques de *T. solium* sont prélevés sur porcs ladres et broyés en présence d'inhibiteurs de protéases. Une purification des protéines totales par chromatographie d'exclusion ou "gel filtration" en tampon Tris 20 mM, NaCl 0,5 M, pH=7,4 en utilisant une colonne Sephadex-G25 (Pharmacia, système AKTA purifier, GE-Healthcare Life Sciences) est ensuite réalisé à partir du surnageant du broyat brut les cysticerques de *T. solium*. Les glycoprotéines antigéniques natives sont ensuite purifiées par chromatographie d'affinité sur une colonne de lectine [Concanavaleine A (ConA) couplée à la Sépharose-4B (Amersham Biosciences)]. La fraction antigénique CS50 ainsi obtenue est utilisée dans les tests sérologiques pour le diagnostic de la cysticerose Humaine. La CS50 déjà produite à l'Unité avant le début de mon stage de Master a été utilisé pour les tests d'ELISA-CS50 et d'EITB-CS50.

#### 2. Protéines recombinantes de *T. solium*

Dans les travaux menés au cours de la présente étude, les antigènes de la famille des glycoprotéines membranaires de 8kDa de *T. solium* ont été ciblé et plus particulièrement les glycoprotéines GP8, GP14 et GP18, intéressantes en termes de sérodiagnostic de la cysticerose (Tsang *et al.*, 1989 ; Greene *et al.*, 2000, Bae *et al.*, 2010). Les gènes codant pour ces trois glycoprotéines ont été amplifiés et clonés dans un plasmide (pMal-c2X, New EnglandBiolabs) permettant de produire des protéines en système bactérien. Les protéines sont produites en fusion avec la Maltose-Binding Protéine (MBP en position N-Terminale) et portent une étiquette Histidine-Tag (6xHis-Tag) en position C-terminale. Après transformation de bactéries compétentes (*E. coli* Rosetta2, New EnglandBiolabs), les protéines recombinantes nommées T8, T14 et T18 correspondant respectivement aux glycoprotéines GP8, GP14 et GP18 natives, couplées à la MBP et avec un

Tag-Histidine, ont été obtenues en quantité suffisante et avec une pureté optimale pour permettre la réalisation de tests immunologiques.

Les détails concernant la production de ces protéines (Thèse de doctorat, communication interne) ne sont pas développés dans ce rapport. Nous avons directement utilisé les protéines recombinantes solubles déjà produites et conservées à -80°C pour évaluer leur intérêt (antigénicité, spécificité et sensibilité) dans le diagnostic de la cysticerose porcine. Avant leur utilisation, la concentration des protéines recombinantes produites a été déterminée (mesure sur un spectrophotomètre de type nanodrop) et leur qualité/pureté (masse moléculaire attendue) a été vérifiée après une migration sur gel de polyacrylamide SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

## II. TESTS SEROLOGIQUES

### 1. Test ELISA

#### a. Principe du test ELISA

L'ELISA ou « Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay » est un test immunologique quantitatif destiné à détecter et à doser des anticorps (ou des antigènes) présents dans un liquide biologique (plasma, sérum, liquide céphalo-rachidien, ...). Dans le cadre de ce master le test ELISA développé est un test permettant la détection des anticorps (IgG) dirigés contre les glycoprotéines de cysticerques de *T. solium*. Dans ce test ELISA-Anticorps (ELISA indirect), le dosage des anticorps présents dans les sérums de porcs se fait grâce à l'utilisation de biomarqueurs (antigènes) et d'un deuxième anticorps couplé à une enzyme (la peroxidase) qui va dégrader un substrat chromogénique (ou fluorescent) et permettre un dosage par spectrométrie. L'intensité du signal émis est proportionnelle à la quantité initiale d'anticorps présents dans l'échantillon biologique.

#### b. Mise au point de la technique ELISA-CS50

Le test ELISA utilisé pour le diagnostic de la cysticerose permet de détecter les anticorps (IgG) dirigés contre les glycoprotéines (CS50) exprimées par les métacestodes de *T. solium*. La solution antigénique CS50, déposée dans les puits d'une microplaque d'ELISA de 96 puits, est incubée pendant une nuit à 4°C. Ainsi une partie des protéines s'adsorbent sur la surface des puits. Les protéines antigéniques non adsorbées sont enlevées par une série de lavage de la plaque.

Les sérums de porcs à tester sont ensuite ajoutés et il y a formation de complexes immuns antigène-anticorps (Ag-Ac). Ces complexes immuns seront ensuite révélés par l'addition d'un deuxième anticorps et dirigé contre des immunoglobulines (IgG) de porc. Cet anticorps secondaire est conjugué à une enzyme qui permettra de dégrader le substrat chromogénique. Le substrat natif incolore génère après l'action de l'enzyme une coloration dont l'intensité, mesurée en unité de Densité Optique (DO), est proportionnelle à la teneur en complexes Ag-Ac-conjugués, donc proportionnelle au taux d'anticorps spécifiques contenu dans l'échantillon biologique.

Les ELISA-CS50-porc ont été réalisés en utilisant le protocole général suivant : 100µl de l'extrait de glycoprotéines CS50 dilué dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline 1X, Sigma) et contenant 0,05 à 0,1µg d'antigène sont déposés dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat (Immulon2, Thermo Scientific, Ref 3455). La plaque est ensuite incubée à 4°C pendant une nuit. Après 4 lavages en tampon PBS-Tween (Tampon de lavage : PBS 1X, 0,05% Tween 20), chaque puits est saturé par ajout de 150 µl (pipette multicanaux LABSYSTEM) d'une solution de PBS-Tween-Lait (PBS 1x, 0,05% de Tween 20, 5% de Régilait) ou de PBS-Tween-Caséine (PBS 1x, 0,05% de Tween 20, 1% Caséine) afin d'empêcher la fixation non spécifique des anticorps contenus dans les sérums à tester. Le dépôt des sérums contenant les anticorps suit l'étape de saturation : 100 µl de sérums dilués au 1/200 en tampon PBS-Tween-Lait (ou PBS-Tween-caséine) sont ajoutés dans chaque puits. Chaque sérum a été testé en duplicate. Après 2h d'incubation à 37°C et 5 lavages en Tampon de lavage, 100 µl d'anticorps secondaire (anticorps anti-IgG de porc, Goat anti-Pig-IgG Fc-fragment HRP-conjugated Antibody, BETHYL Laboratories) couplé à la peroxidase-de-Raifort (HRP) et dilué à différentes concentrations (dilution variant entre 1/15 000 et 1/30 000) en tampon PBS-Tween-Lait (ou PBS-Tween-caséine) sont déposés dans chaque puits. Après 1h30 d'incubation à 37°C et 5 lavages en Tampon de lavage, 100 µl de substrat chromogénique (OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) préparé extemporanément sont déposés dans chaque puits et la plaque est incubée 10 minutes à 37°C. La réaction enzymatique est arrêtée par ajout de 100µl d'une solution d'acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2,5N). La lecture des densités optiques (DO) de chaque puits est réalisée sur un spectrophotomètre (Labsystem multiscan Plus) à une longueur d'onde de 492 nm

pour l'OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou 450 nm pour le TMB/ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Un contrôle positif (sérum de porc présentant des cysticerques à l'abatage et positif en EITB-CS50) et un contrôle négatif (sérum de porc sans cysticercose provenant de zones non-endémique et négatif en EITB-CS50) ont systématiquement été utilisés dans chaque plaque.

Pour l'interprétation des résultats du test ELISA, le seuil de positivité a été calculé à partir des échantillons négatifs en utilisant la formule suivante :

**Moyenne (DO échantillons négatifs) + 3x Ecartype (DO échantillons négatifs).**

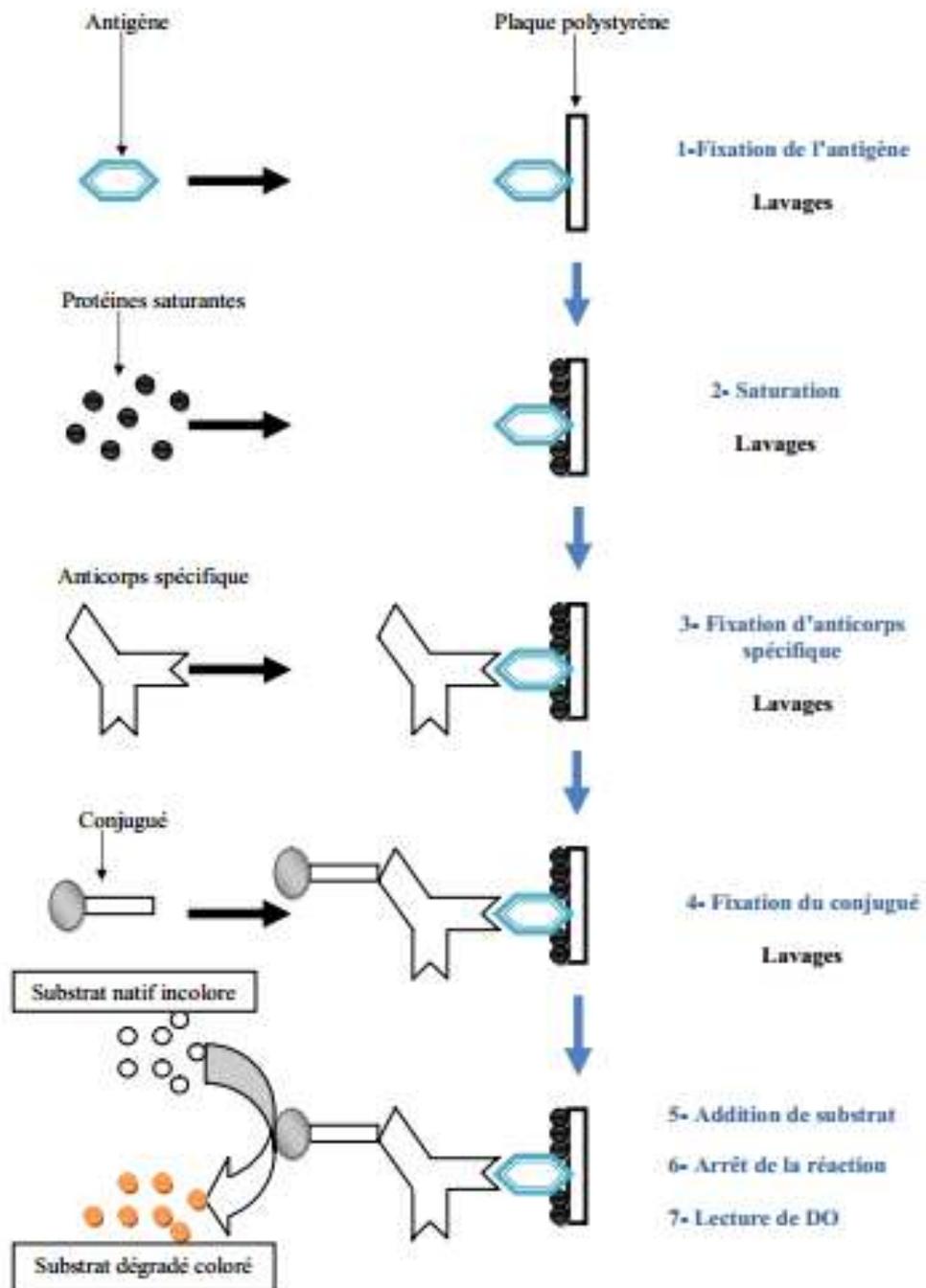
Un test d'EITB-CS50 a été réalisé pour chaque échantillon afin de confirmer les résultats d'ELISA-CS50.

### c. Validation des protéines recombinantes par la technique ELISA

Les ELISA ont été réalisées sur trois protéines recombinantes (T8, T14 et T18) couplées à la MBP et sur la MBP seule comme protéine de contrôle (témoin négatif pour enlever les bruits de fond due à une reconnaissance non-spécifique de la MBP). Le principe du test ELISA utilisé pour l'analyse des réactivités immunologiques sur les antigènes recombinants est le même que celui décrit ci-dessus pour l'analyse des sérums avec la préparation antigénique CS50.

Après la dilution des protéines recombinantes avec du PBS 1X, une concentration de 0,1 µg de chaque protéine recombinante a été déposée dans chaque puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat (Immulon2, Thermo Scientific, Ref 3455). Après une nuit d'incubation à 4°C et 3 lavages en tampon PBS-Tween (Tampon de lavage : PBS 1X, 0,05% Tween 20), les sérums de porc ont été dilués à 1/400 en tampon PBS-Tween-Caséine (PBS 1x, 0,05% de Tween 20, 1% Caséine) et incubés pendant 2h d'incubation à 37°C. Après 5 lavages en Tampon de lavage, 100 µl d'anticorps secondaire (Goat anti-Pig-IgG Fc-fragment HRP-conjugated Antibody, BETHYL Laboratories) dilués au 1/15000 en tampon PBS-Tween-caséine sont rajoutés dans chaque puit. Après 5 lavages en PBS-Tween les réactions antigènes-anticorps sont révélées par addition de 100µL par puits de substrat OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ensuite, les mêmes étapes décrites ci-dessus sont appliquées pour l'arrêt de la réaction enzymatique et la lecture de la DO.

La figure 9 montre la description schématique de la technique ELISA.

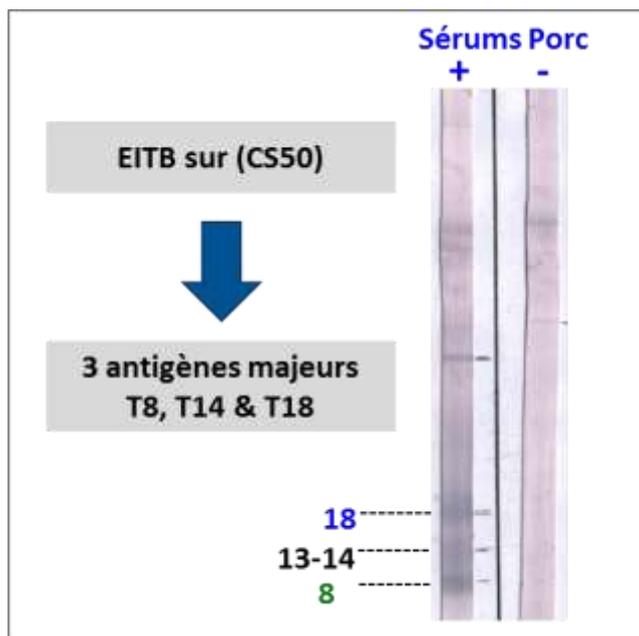


**Figure 9** : Etapes de la technique ELISA (RAMANDANIRAINY, 2012)

## 2. TEST WESTERN BLOT (EITB-CS50)

L'EITB, encore appelé Western blot ou immunoblotting est un test sérologique qualitatif qui consiste à détecter une ou plusieurs protéines qui sont immobilisées sur une membrane de nitrocellulose, et contre lesquelles sont dirigés les anticorps.

Les protéines sont séparées (selon leurs poids moléculaires) par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon la technique du SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Ces protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite incubée avec les sérums de porcs à tester. Les réactivités immunologiques protéines-anticorps sont révélées par l'ajout d'un anticorps secondaire anti-IgG de porc couplé à la phosphatase alcaline (PA) et par une réaction immuno-enzymatique (ajout du substrat de la PA : le NBT (Nitro Blue Tetrazolium, Sigma) BCIP (5-bromo-4-Chloro-3-Indol Phosphate, Sigma). La réaction est arrêtée en transférant la membrane dans de l'eau. La figure suivante montre les résultats du test EITB avec des sérums de porc sain et malade.



**Figure 10 : EITB-CS50**

# **RESULTATS**

## RESULTATS

### I. CLASSIFICATION DES SERUMS DE PORCS

Pour valider les tests ELISA (sensibilité et spécificité) réalisés sur l'extrait de glycoprotéine natives CS50 et/ou sur les protéines recombinantes produites en système bactérien, un choix des sérums de porcs validés comme atteints ou pas de cysticerose est nécessaire.

Les sérums de porcs négatifs ont été définis comme des sérums provenant de porcs élevés en zone non-endémique pour la cysticerose et testés négatifs par EITB-CS50 (test de référence sérologique). Les sérums de porcs positifs ont été définis comme des sérums provenant de porcs présentant des cysticerques détectables par langageage (et/ou visibles après inspection approfondie des carcasses) et testés positifs par EITB-CS50. Pour renforcer cette classification, une détection des antigènes circulants de *T. solium* a aussi été réalisée sur ces sérums en utilisant un ELISA commercial utilisant des anticorps recombinants B158/60 et développé par Dorny et al., 2004 (Kit Cysticercosis Antigen (Ag)-ELISA, ApDia).

Cette étape de sélection des sérums positifs ou négatifs a été réalisée en utilisant une biobanque de 63 sérums de porcs atteints ou pas de cysticerose. Cette biobanque était composée de :

- Douze sérums de porcs provenant de l'abattoir d'Arivomamo (Région d'Itasy) et pré-diagnostiqué par les méthodes de langageage et/ou d'examen approfondis des carcasses ainsi que par l'utilisation d'un scanner portatif (Master de Céline LACROIX, IPM-2016)
- Onze sérums de porc (appelés LNDV) provenant des élevages à Madagascar et de deux abattoirs d'Antananarivo (Anosizato et Anosipatrana)
- Quarante sérums de porcs sains provenant de zones non-endémiques à la cysticerose (appelés BELG)

Les résultats obtenus résumés dans le **Tableau 1** ci-dessous, montrent que chez 20 porcs, qui présentaient des cysticerques détectables (langageage, examen de la carcasse et/ou scanner), des anticorps anti-*T. solium* (EITB-CS50) et des antigènes circulants de *T. solium* (Ag-ELISA) ont été détectés spécifiquement et de façon reproductible chez 11 porcs. Ces 11 sérums (Cel-01, Cel-02, Cel-03, Cel-08, Cel-09, Cel-12, Cel-14, LNDV283, LNDV273, LNDV277, LNDV279) ont donc été choisis comme sérums de référence positifs pour la cysticerose (**Vrais Positifs**). Pour les sérums de référence négatifs (**Vrais Négatifs**), 40 porcs élevés en zone non-

endémique (Belgique) et ne présentant aucun cysticerque détectable à l'abattage ont été sélectionnés car ils se sont révélés négatifs en EITB-CS50 et en test Ag-ELISA (BELG01 à BELG40).

**Tableau 1** : Caractérisation des 63 sérums de porcs à utiliser dans les mises au point des ELISA sur CS50 ou sur protéines recombinantes.

N° du Prélèvement	Origine des porcs	Charge en Cysticerques*	EITB-CS50	Résultats Ag-ELISA <sup>#</sup>
Cel-01	Arivonimamo	Forte	Positif	Positif
Cel-02	Arivonimamo	Forte	Positif	Positif
Cel-03	Arivonimamo	Forte	Positif	Positif
Cel-08	Arivonimamo	Forte	Positif	Positif
Cel-09	Ambohitramby	Moyenne	Positif	Positif
Cel-12	Kandreho	Moyenne	Positif	Positif
Cel-14	Ambohitramby	Forte	Positif	Positif
Cel-10	Amboanama	Moyenne	Positif	Douteux
Cel-11	Kandreho	Moyenne	Positif	Douteux
Cel-15	Betaim-boay	Moyenne	Positif	Douteux
LNDV283	Tsiroanomandidy	Faible	Positif	Positif
LNDV039	Ambohimaso	Faible	Positif	Douteux
LNDV043	Ambohimaso	Faible	Positif	Négatif
LNDV246	Morondava	Faible	Positif	Négatif
LNDV269	Ambohimaso	Moyenne	Positif	Négatif
LNDV270	Amboasary	Faible	Positif	Négatif
LNDV273	Amboasary	Forte	Positif	Positif
LNDV277	Amboasary	Moyenne	Positif	Positif
LNDV279	Amboasary	Faible	Positif	Positif
LNDV286	Ambositra	Faible	Positif	Négatif
Cel-04	Arivonimamo	0	Négatif	Négatif
Cel-05	Arivonimamo	0	Négatif	Négatif
LNDV04	Amboasary	0	Négatif	Négatif
BELG01 à BELG40	Belgique	0	Négatif	Négatif

\* Les porcs ont été classés suivant leur charge en cysticerques, 0: pas de cysticerques détectés, Faible : 1-10 cysticerques, Moyenne : 11-100 cysticerques et Forte : >100 cysticerques.

# Les résultats des Ag-ELISA (Kit ApDia) sont donnés en fonction du calcul de l'Index de positivité (selon les recommandations du fournisseur) : Négatif : Index  $\leq$  0,8 ; Positif : Index  $\geq$  1,3 et Douteux : Index compris entre 0,8 et 1,3.

Ces sérums de référence positifs et négatifs ont été utilisés dans les différents tests ELISA développés au cours de ce master.

## II. MISE AU POINT DE L'ELISA-CS50 POUR LA DETECTION DES ANTICORPS ANTI-*T. SOLIUM* PRESENTS DANS LE SERUM DE PORC

Le test ELISA-CS50 utilisé en routine au sein de l'Unité d'Immunologie des Maladies Infectieuses, basé sur l'utilisation des glycoprotéines totales purifiées de *T. solium* (préparation antigénique CS50), a été spécifiquement développé pour le diagnostic de la cysticercose Humaine. La première partie de mon travail de Master a été d'adapter cette technique pour le diagnostic de la cysticercose porcine.

Pour ce faire, le protocole de routine a été modifié afin de mettre en place les différentes conditions requises pour la détection des IgG porcines. Les différentes conditions testées en ELISA-CS50-porc sont résumées dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2** : Conditions expérimentales optimisées pour la détection des anticorps anti-*T. solium* présents dans les sérums de porc.

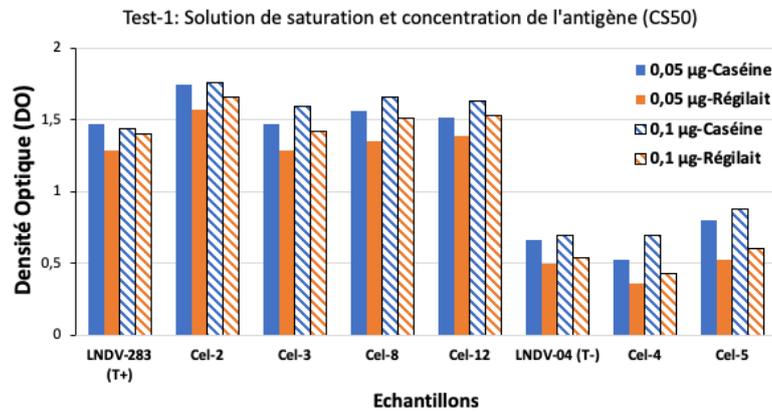
<b>ELISA-CS50-porc</b>			
Concentration de l'antigène CS50	0,05 µg/puits	0,1 µg/puits*	
Tampon de saturation	PBS 1x - 0,05 % Tween 20 - 1% Caséine* <b>Ou</b> PBS 1x - 0,05 % Tween 20 - 5% Régilait		
Dilution de l'anticorps secondaire	1/15000	1/20000	1/30000
Substrat chromogénique	OPD/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> *		TMB/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Longueur d'onde pour la mesure de la DO	492 nm*		450 nm

\* Conditions de l'ELISA-CS50 pour le diagnostic de la cysticercose Humaine.

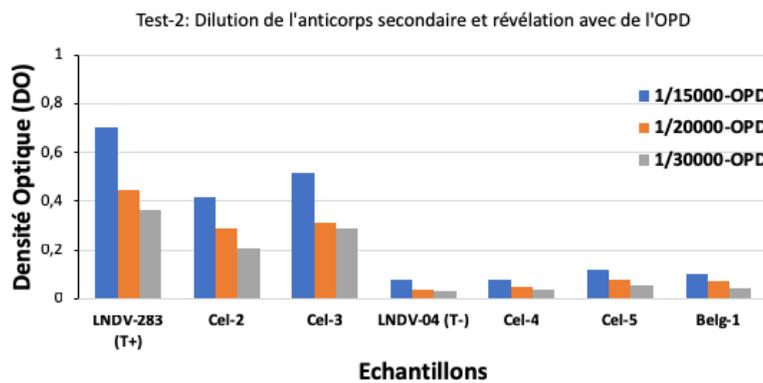
OPD : orthophénylène diamine dihydrochloride ; TMB : 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine ; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : eau oxygénée.

Pour ces tests de mise au point, cinq sérums de porcs atteints de cysticercoses (LNDV-283, Cel-2, Cel-3, Cel-8, et Cel-12) et quatre sérums de porcs sains (LNDV-04, Cel-4, Cel-5 et Belg-1) ont été utilisés. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 11**.

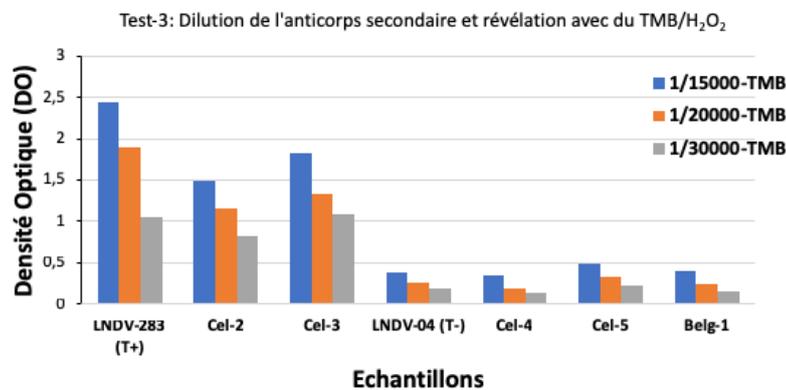
**A**



**B**



**C**



**Figure 11** : Résultats des tests de mise au point de l'ELISA-CS50 pour la détection des anticorps (IgG) de porcs dirigés contre les glycoprotéines de *T. solium*.

Les résultats obtenus montrent que les réactivités immunologiques détectées en utilisant 0,1 µg/puits ou 0,05 µg/puits d'antigène CS50 sont similaires (Figure 9A). De même ces réactivités immunologiques sont comparables lorsque les protéines contenues dans le lait (Régilait) ou de la caséine sont utilisées lors de l'étape de saturation des plaques (Figure 9A). Toutefois, les densités optiques obtenus avec les sérums de porcs sains (LNDV-04, Cel-4 et Cel-5) sont élevées (DO > 0,5) comparées à celles obtenues avec des sérums humains prélevés sur des sujets ne souffrant pas de cysticerose (DO seuil = 0,3). Pour obtenir de meilleurs résultats, des tests complémentaires ont été réalisés pour trouver la dilution d'anticorps secondaire (Goat anti-pig IgG couplé à la peroxydase) optimale ainsi que le substrat chromogénique (OPD ou TMB) adéquat (Figure 9B et 9C). Les résultats obtenus montrent qu'une dilution de l'anticorps secondaire au 1/20000 et une révélation des complexes anticorps-antigènes avec de l'OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permettent d'obtenir des résultats satisfaisants : les réactivités immunologiques avec les sérums de porcs sains sont faibles (bruits de fond : DO < 0,08) tandis que celles des sérums de porcs infestés de cysticerques sont élevées.

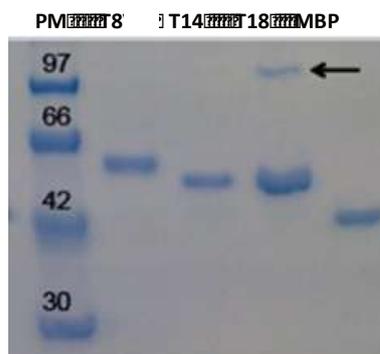
L'ensemble des tests réalisés lors de la mise au point de l'ELISA-CS50-porc nous ont permis de trouver les conditions expérimentales optimales (rapport de DO des échantillons positifs/échantillons négatifs >3) pour réaliser les analyses sérologiques par ELISA-CS50 en utilisant des sérums de porcs. Le **Tableau 3** ci-dessous résume les conditions retenues pour les ELISA-CS50-porc.

**Tableau 3** : Conditions retenues pour la réalisation des ELISA-CS50-porc

<b>ELISA-CS50-porc</b>	
Concentration de l'antigène CS50	0,05 µg/puit
Tampon de saturation	PBS 1x - 0,05 % Tween 20 - 1% caséine
Dilution de l'anticorps secondaire	1/20000
Solution de révélation (substrat chromogénique)	OPD/ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Longueur d'onde pour la mesure de la DO	492 nm
Seuil de positivité	0,2

### III. ANALYSE DE LA QUALITE DES PROTEINES RECOMBINANTES SUR GEL DE POLYACRILAMIDE SDS-PAGE

Avant d'utiliser les antigènes de *T. solium* produits sous forme de protéines recombinantes solubles (T8, T14 et T18), il est nécessaire d'effectuer une migration sur gel de polyacrilamide SDS-PAGE pour voir si elles ne sont pas dégradées. La **Figure 12** illustre, pour chaque antigène, la présence d'une protéine couplée à la MBP à la taille attendue. Les masses moléculaires attendues sont respectivement de 42,51 kDa, 51,71 kDa, 51,63 kDa et 51,66 kDa pour la MBP seule, MBP+T8, MBP+T14, et MBP+T18. Au cours de cette étape de vérification des protéines nous avons constaté que (1) la protéine T14 se dégrade rapidement même lorsqu'elle est conservée à -80°C et que (2) en condition native (non-réduites), la protéine T18 tend à se dimériser (montré par une flèche). Cette dimérisation est fortement diminuée en présence d'un agent réducteur (le  $\beta$ mercaptoéthanol ou le DTT) et n'interfère pas avec l'antigénicité de la protéine.



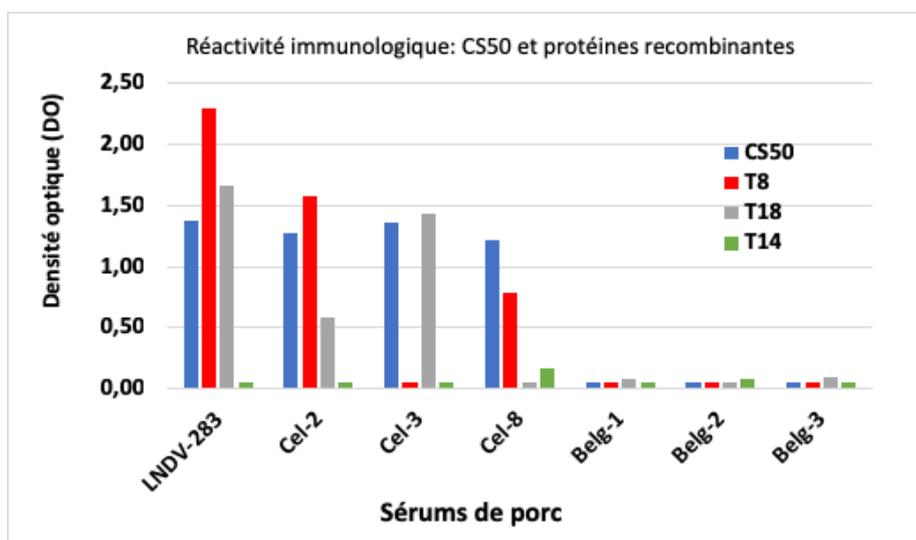
**Figure 12** : Identification des protéines recombinantes T8, T14, T18 et MBP après migration sur gel SDS-PAGE (en présence de DTT) et coloration au bleu de Coomassie.

### IV. VALIDATION DES PROTEINES RECOMBINANTES T8, T14 ET T18 PAR LA TECHNIQUE ELISA

#### 1. Antigénicité et seuil de positivité

Dans un premier temps nous avons vérifié par la technique ELISA l'antigénicité de chacune des protéines de *T. solium* produite sous forme de protéines recombinantes solubles. Les résultats montrent que les sérums de porcs positifs en EITB-CS50 et en ELISA-CS50 (porcs atteints de cysticerose : LNDV-283, Cel-2, Cel-3 et Cel-8) contiennent des anticorps anti-*T. solium* capables de reconnaître spécifiquement les protéines recombinantes T8, T14 et T18. Toutefois cette reconnaissance est très

variable d'un sérum de porc à l'autre et les protéines T8 et T18 sont plus reconnues que la protéine T14. Tous les sérums de porcs provenant de zone non-endémique (sérums BELG-1 à 3) ne présentent aucune réactivité immunologique détectable contre les protéines testées (figure13).



**Figure 13** : Analyse par ELISA de l'antigénicité des protéines recombinantes T8, T18 et T14. Réactivités immunologiques des sérums de porcs atteints ou pas de cysticerose.

Le seuil de positivité pour chaque protéine recombinante a été calculé à partir de 10 sérums négatifs en anticorps anti-*T.solium* venant de zone non-endémique à la cysticerose (Belgique, sérums BELG1-BELG10).

Le **Tableau 4** résume les valeurs des DO seuils obtenus pour chaque protéine recombinante.

**Tableau 4**: Seuil de positivité des protéines recombinantes

	<b>T8</b>	<b>T14</b>	<b>T18</b>
<b>Moyenne des échantillons négatifs</b>	0,0374	0,025	0,0318
<b>Ecartype</b>	0,058	0,044	0,042
<b>DO seuil = Moyenne + 3x Ecartype</b>	<b>0,21</b>	<b>0,16</b>	<b>0,16</b>

## 2. Détermination de la spécificité et de la sensibilité des ELISA sur protéines recombinantes

La sensibilité (capacité d'un test à identifier correctement les individus malades grâce à une réponse positive) et la spécificité (capacité d'un test à identifier correctement les individus non malades grâce à une réponse négative) sont deux paramètres importants à déterminer lors de la validation d'un test de diagnostic biologique. Le test de référence sérologique EITB-CS50 a été utilisé pour évaluer les tests ELISA mis au point sur les 3 protéines recombinantes ciblées (T8, T14 et T18). Les résultats obtenus avec la biobanque de sérum de porc sont montrés dans le **Tableau 5**.

**Tableau 5** : Nombre de sérums positifs par ELISA sur protéines recombinantes par rapport au test de référence sérologique EITB-CS50

	EITB-CS50 positif N = 11	EITB-CS50 négatif N = 30
<b>ELISA-T8</b>	10	28
<b>ELISA-T14</b>	2	29
<b>ELISA-T18</b>	10	30

Ces résultats nous ont permis de calculer **la sensibilité (VP/VP+FN)** et **la spécificité (VN/VN+FP)** pour chaque test ELISA en se basant sur le tableau de contingence défini comme suit (voir **Tableau 6**).

**Tableau 6** : Tableau de contingence pour le calcul de la spécificité (Sp) et de la sensibilité (Se) des tests ELISA sur protéines recombinantes.

	EITB-CS50 Positif	EITB-CS50 négatif
<b>ELISA-T8 positif</b>	VP (n = 10)	FP (n = 2)
<b>ELISA-T8 négatif</b>	FN (n = 1)	VN (n = 28)
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>30</b>

VP : vrai positif, FP : faux positif, FN : faux négatif et VN : vrai négatif.

Exemple avec les résultats obtenus avec les ELISA-T8.

**Tableau 7** : Évaluation de la sensibilité et spécificité des tests ELISA réalisés avec les trois protéines recombinantes de *T. solium*.

	ELISA		
	T8	T14	T18
<b>Sensibilité (Se)</b>	90,9%	18,2%	90,9%
<b>Spécificité (Sp)</b>	93,3%	96,7%	100%

Les résultats obtenus montrent que, parmi les 3 protéines recombinantes ciblées, la T18 et la T8 sont de bons marqueurs sérologiques pour la détection de la cysticerose porcine avec un test ELISA-T18 présentant une Se de 90,9% et une Sp de 100% et un test ELISA-T8 montrant une Se équivalente à la Se-T18 et une Sp de 93,3%. Les réactivités anticorps avec la protéine recombinante T14 sont faibles ce qui ne permet pas de distinguer les sérums de porcs positifs et négatifs pour la cysticerose et qui se traduit par une très faible sensibilité.

### 3. Etude des réactions croisées

Pour l'étude des réactions croisées, 14 sérums provenant de porcs atteints de Trichinellose (zoonose parasitaire tissulaire due à un nématode du genre *Trichinella*) et indemne de cysticerose (porcs élevés en Belgique et infectés expérimentalement) ont été testés par ELISA sur chacune des protéines recombinantes. Les résultats obtenus montrent que parmi les 14 sérums testés, 6 contiennent des anticorps capables de détecter la protéine T8. Aucune réactivité croisée n'a en revanche été détectée sur les protéines T14 et T18.

**L'ensemble des résultats obtenus au cours des tests de mise au point et de validation des trois antigènes de *T. solium* produits sous formes de protéines recombinantes solubles montrent que la protéine T18 serait un biomarqueur intéressant à utiliser pour le développement d'un test de diagnostic pour la cysticerose porcine.**

# **DISCUSSION**

## DISCUSSION

Les activités de recherches concernant la cysticerose humaine et porcine se concentrent surtout sur des études épidémiologiques en vue de réduire la prévalence de cette maladie dans les zones où elle est endémique.

A Madagascar, à côté des pathologies porcines les plus étudiées en santé animale comme maladie de Teschen et la peste porcine Africaine (PPA), la cysticerose préoccupe de plus en plus les services vétérinaires et les éleveurs. En effet, ces derniers classent la cysticerose porcine au premier rang des pathologies qui frappent l'espèce en termes de prévalence [prévalence estimée à 21% dans les abattoirs d'Antananarivo (Porphyre *et al.*, 2015)] et de la perte économique engendrée. De surcroît, la cysticerose porcine a un impact majeur en santé Humaine.

A l'heure actuelle, les techniques utilisées pour le diagnostic de la cysticerose porcine sont le système de langage et l'inspection post-mortem des carcasses de viande. Toutefois, ces deux techniques, malgré leurs hautes spécificités (99-100%) sont peu sensibles surtout lorsque les porcs sont peu infestés (Dorny, 2004).

Le sérodiagnostic pour la détection des anticorps anti-*T. solium* ou des antigènes circulants de *T. solium*, est coûteux et difficilement réalisables en zone d'endémies car ils nécessitent du matériel et des réactifs spécifiques ainsi qu'un personnel qualifié. Par conséquent, ces sérodiagnostics (Ag-ELISA, ELISA-CS50 et Western-Blot/EITB-CS50) développés pour le diagnostic de la cysticerose Humaine doivent être adaptés aux analyses réalisés chez le porc. L'ELISA-CS50 et l'EITB-CS50 dépendent aussi d'une collecte périodique de parasites sur porc contaminé et de la préparation de nouveau lot d'antigènes ce qui ajoute une variabilité supplémentaire dans la réalisation des tests. Pour finir, les réactivités immunologiques détectées par EITB-CS50 (test de référence) sont souvent difficiles à interpréter car le niveau de glycosylation des antigènes natifs joue sur la netteté et la masse moléculaire apparente des bandes détectées.

Dans ce contexte, il est nécessaire de développer de nouveaux tests de diagnostic ou d'améliorer les tests sérologiques existant pour le diagnostic de la cysticerose porcine. Pour répondre à cette problématique, les travaux réalisés durant mon Master visaient d'une part à adapter L'ELISA-CS50, utilisé pour le diagnostic de la cysticerose humaine, à celui de la cysticerose porcine et d'autre part à développer

de nouveaux tests sérologiques de type ELISA basés sur l'utilisation de trois antigènes de *T. solium* produits sous forme de protéines recombinantes solubles (T8, T14, et T18). Ces validations ont été réalisées en utilisant comme test de référence l'EITB-CS50 associée à une inspection post-mortem approfondie des carcasses de porcs. Les résultats préliminaires obtenus sont très prometteurs avec la mise au point d'un test ELISA avec la protéine T18 qui présente une spécificité de 100% et une sensibilité de 90,9% sans cross-réactivités détectables avec des sérums de porcs atteints de Trichinellose.

L'extrait antigénique CS50 est une combinaison d'antigènes glycosylés extraits de cysticerques broyés puis fractionnés sur une colonne concanavaleine (Andriatsimahavandy, 2003). Concernant le test ELISA-CS50, des études ont montrées que ses performances sont très variables suivant le type d'antigène utilisé, les techniques de préparation de l'antigène et selon qu'il s'agisse des infections de terrains ou expérimentales (Tchamad, 2007). Une étude antérieure réalisée au sein de l'IPM sur la situation épidémiologique de la cysticercose a montré que l'antigène CS50, pour une DO seuil de 0,4 et une reproductibilité de 97%, présente une spécificité de 97,4% et une sensibilité de 96,3% (Andriatsimahavandy *et al.*, 2003). Une autre étude faite sur des sérums de porcs a donné une sensibilité de l'ordre de 71% avec une DO seuil 1.5 (Rasoamampianiana *et al.*, 2012). Cette sensibilité est élevée par rapport aux résultats d'autres études qui ont trouvé une sensibilité de l'ordre de 55.5%. Ces résultats soulignent les variabilités de performances de cette technique surtout chez le porc. Les mises au point réalisées sur l'ELISA-CS50 au cours de ce Master nous ont permis d'améliorer le seuil de positivité (DO seuil = 0,2). Toutefois des expériences complémentaires restent à réaliser sur la biobanque de sérums de porcs venant de zones non-endémiques (BELG1-BELG40) afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'ELISA-CS50-porc utilisant le nouveau protocole établi. Des analyses seront aussi à réaliser sur différents lots de CS50.

Un développement de nouveaux tests ELISA utilisant des protéines recombinantes solubles produites en système bactérien (appelées dans cette étude T8, T14 et T18) a été initié durant ce Master. Ces protéines correspondent à la forme recombinante des trois glycoprotéines (GP8, GP14 et GP18) majoritairement immunogéniques de l'extrait de glycoprotéines de la CS50. Contrairement à la T8 et à la T18, les

réactivités immunologiques obtenues avec des sérums de porcs atteints de cysticercose sur la T14 sont très faibles. Ces faibles réactivités anticorps (IgG) détectées avec la T14 peuvent s'expliquer par le fait que la T14 est une protéine instable qui se dégrade rapidement au cours du temps ce qui influe grandement sur la qualité de la protéine au cours des ELISA. D'autre part les protéines produites en système bactérien (*Escherichia coli*) ne sont pas glycosylées ce qui peut également altérer leur antigénicité.

En utilisant des conditions optimisées avec chacune des trois protéines recombinantes, la sensibilité et la spécificité des tests ELISA étaient de 91% et 93% ; 18% et 97% ; 91% et 100% respectivement pour les recombinantes T8 ; T14 et T18. Ces tests de performance réalisés avec les 3 protéines montrent une sensibilité et une spécificité plus importante avec la protéine recombinante T18. D'ailleurs, des études ont montrées que cet antigène s'avère être très efficace pour induire des niveaux de protection élevée après vaccination chez le porc et serait être impliqué dans la phase active de l'infection (Sciuto *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 2008; Ramiandrisoa *et al.*, 2012, Aluja *et al.*, 1996). Les différents tests préliminaires en ELISA et en EITB décrit dans la littérature et utilisant des protéines recombinantes, ont montré une spécificité élevée mais avec une sensibilité inférieure à celle de l'extrait de glycoprotéines native CS50 (Dorny *et al.*, 2003 ; Greene *et al.*, 2000 ; Hancock *et al.*, 2003). Cette baisse de sensibilité est probablement due à l'absence de glycosylation sur les protéines recombinantes produites et à leur utilisation de façon individuelle dans les tests réalisés. Une combinaison de plusieurs protéines recombinantes antigéniques pourrait être envisagée dans les développements ultérieurs pour améliorer la sensibilité des tests ELISA. De même une production de ces protéines recombinantes en utilisant des systèmes de productions eucaryotes à partir de cellules de mammifère (HEK293, CHO, COS-7) ou d'insecte (S2, Sf9) assurant la plupart des modifications post-traductionnelles (ponts disulfure, N- et O-glycosylation, phosphorylation, etc) susceptibles d'être importantes pour la structure ou l'antigénicité des protéines produites.

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La cysticerose est une parasitose endémique à Madagascar où tous les facteurs de risque permettant au parasite d'effectuer son cycle de vie et d'engendrer cette parasitose sont présents. Elle est actuellement la cause majeure d'une perte financière pour les éleveurs et est responsable d'une épilepsie majeure chez l'homme, elle constitue donc un problème de santé publique. Les méthodes de diagnostic actuelle de la cysticerose porcine constituent soit essentiellement des méthodes tardives détectant principalement les infestations massives (language ou inspection de carcasses) soit des méthodes lourdes réalisables uniquement en laboratoire spécialisé (EITB). Ainsi le contexte actuel nous invite à développer une nouvelle technique pour faciliter le dépistage de cette maladie chez le porc. Notre but était de valider trois protéines recombinantes T8, T18 et T14 par le test ELISA qui s'avère être une méthode simple et moins coûteuse parmi les tests sérologiques disponibles actuellement. Il a été démontré que la sensibilité et la spécificité d'un test varie d'un antigène à l'autre. Notre étude nous a permis de caractériser l'antigène recombinant T18 qui a été démontré comme étant l'un des antigènes impliqués dans la phase active de la cysticerose porcine. Ces résultats constituent des données préliminaires qui devraient être poursuivies et validées avec une biobanque plus enrichie en sérums de porcs malades ou non de la cysticerose et avec des sérums mieux caractérisés en EITB par vérification de la présence et de l'intensité des différents glycoprotéines d'intérêt. L'étude de la spécificité devrait être approfondie également utilisant une biobanque riche en sérums atteints par d'autres maladies porcines (telles que l'ascaridiose, trichurose, hydatidose et fasciolose). Des systèmes eucaryotes seraient aussi envisageables afin d'améliorer l'antigénicité de ces formes recombinantes.

La présente étude a été consacrée sur l'étude de l'antigénicité des trois protéines recombinantes correspondant aux glycoprotéines majoritairement antigéniques extraites de *T. solium* pour le développement d'un test de diagnostic de la cysticerose porcine basé sur la technique d'ELISA. Après étude plus complète et validation, ces formes recombinantes peuvent être utilisées pour palier au problème de disponibilité des matières premières pour le développement d'un test de diagnostic de la cysticerose porcine à Madagascar.

Ce travail de recherche a pour finalité de participer, par l'intermédiaire de ces tests de diagnostic, aux stratégies de contrôle et de lutte contre la propagation de la cysticerose humaine et porcine à Madagascar.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Andriantsimahavandy A., Rabarijaona L.P., Ramarokoto C.E., Leutscher P., Migliani R. Situation épidémiologique actuelle de la cysticerose à Madagascar., 2003. *Arch Inst Pasteur de Madagascar*. 69 : 46-51
2. Andrianjafy A., 1910 Cysticerose humaine. *Bull Soc Sc Med Madagascar*. 2 : 53-60.
3. Acha N.P., Boris S., 2005 Zoonoses et maladie transmissibles communes à l'Homme et aux animaux. 3ème édition. 3.
4. Aluja A.S., Plancarte A., Rodarte L.F., Hernández M., Sciutto E., 1996 Experimental *Taenia solium* cysticercosis in pigs: characteristics of the infection and antibody response. *Vet Parasitol*. 61(1-2) :49-59.
5. Assana E, Ka,obana K, Tume CB, Zoli PA, Nguekam, Greerts S, Berkvens D, Dorny P., 2006 Isolation of a 14 kDa antigen from *Taenia solium* cyst fluid by HPLC and its evaluation in enzyme linked immunosorbent assay for diagnosis of porcine cysticercosis. *Res Vet Sci*. 82: 370-6.
6. Assana, E., Zoli, P.A., Sadou, H.A., Nguekam, Voundou, L., Pouedet, M.S.R., Dorny, P., Brandt, J., Geerts, S., 2001. Prévalence de la cysticerose porcine dans le Mayo-Danay (Nord-Cameroun) et le Mayo-Kebbi (Sud-Ouest du Tchad). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop*. 54, 123–127.
7. Avode D.G., 1996. Epidémiologie de la neurocysticerose en Afrique Noire. *sMédecine d'Afrique Noire*. 43: 468-471.
8. Baer J.G. Cestodes. *Encyclopedia Universalis*
9. Bouteille B., 2014. [Epidemiology of cysticercosis and neurocysticercosis]. *Med Sante Trop*. 24:367-74.

10. Bronstein J.A., Klotz F., 2005 Cestodes larvaires. EMC- *Maladies Infectieuses*.2 : 59-83.
11. Brandt JR, Geerts S, De Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brijs L, *et al.*, 1992. A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol.* 22:471-7
12. Copado F., de Aluja AS., Mayagoitia L., Galindo F., 2004 : The behaviour of free ranging pigs in the Mexican tropics and its relationships with human faeces consumption. *Applied Animal Behaviour Science.* 88: 243-252.
13. Del Brutto OH, Nash TE, White AC Jr, Rajshekhar V, Wilkins PP, Singh G, Vasquez CM, Salgado P, Gilman RH, Garcia HH., 2017. Revised diagnostic criteria for neurocysticercosis. *J Neurol Sci.* 372:202-210.
14. Praet N., Kanobana K., Kabwe C., Maketa V., Lukanu P., Lutumba P., Polman K., Matondo P., Speybroeck N., Dorny P. *et al.*, 2010. *Taenia solium* cysticercosis in the Democratic Republic of Congo: how does pork trade affect the transmission of the parasite. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 4 (9): 817-817.
15. Diaz JF, Verastegui M, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Gallo C, Garcia HH, Torres P, Montenegro T, Miranda E., 1992. Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot (EITB) assay in Peru. The Cysticercosis Working Group in Peru (CWG). *Am J Trop Med Hyg.* 46(5):610-5.
16. De Giorgio C, Pietsch-Escueta S., Tsang VC., Corral-Leyva G., Ng L., Medina MT., Astudillo S., Padilla N., Leyva P., Martinez L. *et al.*, 2005 : Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. *Acta Neurol Scand.* 111 (2): 84-8.
17. Deckers N, Dorny P. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis., 2010. *Trends Parasitol.* 26: 137-44.

18. Dorny P, Brandt J, Zoli A, Geerts S., 2003. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop.* 87:79-86.
19. Dorny P, Phiri IK, Vercruyse J, Gabriel S, Willingham AL 3rd, Brandt J, Victor B, Speybroeck N & Berkvens D., 2004. A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *International journal for parasitology.* 34: 569-576.
20. Erhart A., Dorny P., De N.V., Vien H.V., Thach C.D., Toan D. N., Cong D.L., Geert S., Speybroeck N., Berkvens D. & Brandt J. 2002. *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Vietnam: sero-prevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. *Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene.* 96: 270-272.
21. Flisser A., Sarti E., Lightowers M., Schantz P., 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop.* 87: 43-51.
22. Ferrer E, Cortez MM, Cabrera Z, Rojas G, Davila I, Alarcon de Noya B, et al., 2005. Oncospherical peptide-based ELISAs as potential seroepidemiological tools for *Taenia solium* cysticercosis/neurocysticercosis in Venezuela. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 99:568-76.
23. Garcia HH. & Del Brutto OH. 2003. Imaging findings in neurocysticercosis. *ActaTropica.* 87:71-78
24. Garcia H.H., DelBrutto O.H., 2005. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. *Lancet.* 4: 653-661.
25. Garcia HH., Parkhouse RM., Gilman RH., Montenegro T., Bernal T., Martinez SM., Gonzalez AE., Tsang VC., Harrison LJ., 2000 : Cysticercosis Working Group in P. 2000. Serum antigen detection in the diagnosis, treatment, and follow-up of neurocysticercosis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94 (6): 673-6.

26. Gonzalez AE, Cama V, Gilman RH, Tsang VC, Pilcher JB, Chavera A, Castro M, Montenegro T, Verastegui M, Miranda E, *et al.* 1990. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 43:194-1999.
27. Gonzalez AE, Gauci CG, Barber D, *et al.*, 2008. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg.* 72: 837–39
28. Grenne, R.M., K.Hancock, P.P. Wilkings, and V.C.N.Tsang. 2000. *Taenia solium* molecular cloning and serologic evaluation of 14- and 18- Kd related, diagnostic antigens. *J.Parasitol.*86 ; 1001-1007
29. Gweba M., Faleke OO., Junaidu AU., Fabiyi JP., Fajinmi AO., 2010: Some risk factors for *Taenia solium* cysticercosis in semiintensively raised pigs in Zuru, Nigeria. *Veterinaria Italiana.* 46 (1): 57-67.
30. Hancock K, Khan A, Williams FB, Yushak ML, Pattabhi S, Noh J, *et al.*, 2003. Characterization of the 8-Kilodalton Antigens of *Taenia solium* Metacestodes and Evaluation of Their Use in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 41(6): 2577–86.
31. Hancock K, Pattabhi S, Whitfield FW, *et al.*, 2006. Characterization and cloning of T24, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 147:109–17.
32. Hancock K, Pattabhi S, Greene RM, Yushak ML, Williams F, Khan A, *et al.*, 2004. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol.* 133:115–24
33. Harrison LJ, Joshua GW, Wright SH, Parkhouse RM., 1989. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* 11:351–70.

34. Li T, Ito A, Craig PS, *et al.*, 2007. Taeniasis/Cysticercosis in China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 38 :131-9.
35. Michel P., Michault A., Gruel J.C., Coulanges P.,1990. Le serodiagnostic de la cysticercose par ELISA et WESTERN BLOT. *ArchInst Pasteur de Madagascar*. 57 (1): 115-142.
36. Michelet L., Carod J-F., Rakotondrazaka M., Ma L., Gay F., Dauga C., 2010 : The pig tapeworm *Taenia solium*, the cause of cysticercosis: Biogeographic (temporal and spacial) origins in Madagascar. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 55: 744-750.
37. Michault A, Duval A, Bertil G, Folio G., 1990. Etude séroépidémiologique de la cysticercose à l'île de la Réunion. *Bull SocPatholExot*.83 : 82-92.
38. Moore, A.C.; *et.al.*1995. Seroprevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* cysticercosis in an Orthodox Jewish community. *Am. J. taeniasis in California, USA. Acta Neurol. Scand., Trop.Med.Hyg.*, 53(5):439-442
39. Monnier L, Andrianjafy.,1910. Cysticercose humaine confluyente. *Bull Soc Sc Med Madagascar*. 2 : 27-29.
40. Mukaratirwa S., Lekule F., 2008: Medical and veterinary doctors, social scientists and agricultural researchers meet to carry forward the fight against cysticercosis, a neglected and fatal disease of the poor: to the editor. *Journal of the South African Veterinary Association* 79 (1): 2.
41. MAEP (2007) Recensement de l'Agriculture, Campagne 2004–2005 (Tome IV), Cheptel Animal, Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage et de la Pêche Madagascar
42. Nakao M, Yanagida T, Okamoto M, *et al.*, 2010.State-of-the-art Echinococcus and Taenia:phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. *Infect Genet Evol*. 10 :444-52.

43. Noh J, Rodriguez S, Lee YM, Handali S, Gonzalez AE, Gilman RH, Tsang VC, Garcia HH, Wilkins PP., 2014. Recombinant protein- and synthetic peptide-based immunoblot test for diagnosis of neurocysticercosis. *J Clin Microbiol.* May;52(5):1429-34.
44. Nguekam, Zoli, A.P., Vondou, L., Pouedet, S.M.R., Assana, E., Dorny, P., Brandt, J., Losson, B. & Geerts, S., 2003. Kinetics of circulating antigens in pigs experimentally infected with *Taenia solium* eggs. *Veterinary Parasitology* 111, 323-332.
45. Pawlowski Z.S., Allan J., Sarti E., 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. *Int J Parasitol.* **35**: 1221-1232.
46. Patel R., Jha S., Yadav R.K., 2006. Pleomorphism of the clinical manifestations of neurocysticercosis. Neurology Department, Sanjay Gandhi PGIMS, Lucknow, India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 100: 134-141.
47. Peters W., Gilles M., 1982. Atlas en couleurs de médecine tropicale et de parasitologie. Maloine s.a. éditeur.
48. Phiri IK, Dorny P, Gabriel S, Willingham AL, Sikasunge C, Siziya S & Vercruyse J. 2006. Assessment of routine inspection methods for porcine cysticercosis in Zambian village pigs. *Journal of helminthology.* 80:69-72.
49. Porphyre V., Rasamoelina-Andriamanivo H., Rakotoarimanana A., Rasamoelina EO., Bernard C., Jambou R., Cardinale E., 2015b: Spatio-temporal prevalence of porcine cysticercosis in Madagascar based on meat inspection. *Parasites & Vectors* 8:391: 1-8.
50. Prasad KN, Prasad A, Verma A, Singh AK., 2008. Human cysticercosis and Indian scenario: a review. *J Biosci.* 33: 571-82.
51. Praet N, Rodriguez-Hidalgo R, Speybroeck N, Ahounou S, Benitez-Ortiz W,

- Berkvens D, et al., 2010. Infection with versus exposure to *Taenia solium*: what do serological test results tell us. *Am J Trop Med Hyg.* 83:413–5
52. RAMANDANIRAINY Prisca., 2012. Etude des classes d'immunoglobulines E, A, D dans la cysticerose humaine. [Thèse]. Sciences naturelles.
53. Ramiandrisoa S., 2014. Identification, et production de protéines pour le test de diagnostic rapide de la cysticerose porcine [Thèse]. Médecine Vétérinaire.
54. Rasoamampianina V., 2012. Les réponses immunitaires du porc contre les fractions protéiques de *Cysticercus cellulosea* [Thèse]. Médecine vétérinaire.
55. Rakotondrazaka M, Raharilaza N, Rakotoarivelo D, Ratsitorahina M, Rabarijaona LP, Ramarokoto CE, Leutcher P, Migliani R., 2003. The current epidemiological situation of cysticercosis in Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar.* 69(1-2): 46-51.
56. Rasamoelina-Andriamanivo H, Porphyre V, Jambou R., 2013. Control of cysticercosis in Madagascar: beware of pitfalls. *Trends in parasitology.* 29(11): 538-547.
57. Raether W., Hanel H., 2003. Epidemiology, clinical manifestations and diagnosis of Zoonotic cestode infections: an update. *Parasitol Res.* 91: 412-438.
58. Rodriguez S, Wilkins P, Dorny P. Immunological and molecular diagnosis of cysticercosis. *Pathog Glob Health* 2012; 106:286–98.
59. R Rodriguez-Hidalgo; W Benitez-Ortiz; N Praet; LR Saa; J Vercruysse; J Brandt; P Dorny., 2006. Taeniasis-cysticercosis in Southern Ecuador: assessment of infection status using multiple laboratory diagnostic tools. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.101 no.7 Rio de Janeiro Nov.
60. Sciutto E, Rosas G, Hernandez M, Morales J, Cruz-Revilla C, Toledo A *et al.* Improvement of the synthetic tri-peptide vaccine (S3Pvac) against porcine *Taenia solium* cysticercosis in search of a more effective, inexpensive and manageable vaccine. *Vaccine.* 2007; 25: 1368-78.

61. Scheel CM., Khan A., Hancock K., Garcia HH., Gonzalez AE., Gilman RH., Tsang VC., Peru CWGi., 2005: Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *The American journal of tropical medicine and hygiene* .73 (4): 771-776.
62. Tchamdja E., 2007 Mise au point et étude des performances d'un test ELISA pour la détection d'anticorps dirigés contre *Cysticercus cellulosae* chez l'Homme [Thèse]. Sciences en Santé Animale tropicale.
63. Tsang VC, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis*. 1989;159: 50-9.
64. Tsang, V.C.W., Pilcher, J.A., Zhou, W., Boyer, A.E., Kamango-Sollo, E.I.P., Rhoads, M.L., Murrell, K.W., Schantz, P.M., Gilman, R.H., 1991. Efficacy of the immunoblot assay for cysticercosis in pigs and modulated expression of distinct IgM/IgG activities to *Taenia solium* antigens in experimental infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 29, 69-78.
65. *Taenia solium*, Taeniasis/Cysticercosis: diagnostic tools. Report of a Stakeholder meeting. Geneva, 17-18 December 2015.
66. Wu W, Qian X, Huang Y, Hong Q., 2012. A review of the control of clonorchiasis in *Taenia solium* / Cysticercosis in China. *Parasitol Res.* 111: 1879-84.
67. World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. OMS, Genève, 2015.

## WEBOGRAPHIE

1. Université Médicale Virtuelle Francophone web site. Taeniasis et Cysticercose  
URL :  
<http://umvf.univnantes.fr/parasitologie/enseignement/taeniasis/site/html/1.html>

Golvan Y. Cysticercoses. *EncyclopediaUniversalis*.

<http://www.universalis.fr/encyclopedia/cestodes>

## ANNEXE I

Protocole ELISA cysticerose CS50 appliqué avec les protéines recombinantes

L'ELISA comprend 7 étapes :

### 1 Sensibilisation de la plaque à l'antigène

- Diluer l'Ag en PBS à la concentration de 1µg/ml (préparer 5ml / plaque) et déposer 100µL /puits (voir schéma de la plaque)
- Incuber une nuit à 4°C
- Laver 4 fois 3min avec PBS-Tween
- Sécher sur un tas de papiers filtres.

### 2 Saturation de la plaque

- Déposer 150µl de tampon de saturation (PBS -T-régilait) dans tous les puits
- Incuber 2 heures à 37°C
- Laver 4 fois 3min en PBS -T Tween
- Sécher des papiers filtres.

### 3 Dépôt de l'échantillon

- Diluer les échantillons (Sérums) en PBS-T Tween -régilait: d=1/200 (4µl sérum dans 800µl).
- Déposer 100µl des échantillons et 100µl des témoins (positif et négatif) dans les puits (voir organisation de la plaque).
- Incuber 1 heure à température ambiante.
- Laver 4 fois 3min avec PBS -Tween .
- Sécher des papiers filtres.

### 4 Addition du conjugué anti-porc (AC anti-IgGporc couplé à la peroxydase)

- Diluer le conjugué au 1/15 000 (1µL dans 15ml) avec le tampon PBS -T- régilait
- Déposer 100µL par puits dans tous les puits sauf la première colonne (blanc substrat).
- Incuber 1heure à température 37°C.
- Laver 4 fois 3min avec PBS -Tween.
- Sécher des papiers filtres.

### **5 Addition de la solution de substrat (OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

Préparer (extemporanément) la solution substrat :

OPD 6mg (chambre froide)

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 15μl (chambre froide)

Dissoudre dans le tampon citrate 12,5ml.

- Déposer 100μl de solution substrat par puits dans tous les puits même dans le blanc substrat (1 ère colonne)
- Incuber 20min à température ambiante

### **6 Arrêt de la réaction immuno-enzymatique**

- Ajouter dans chaque puits 100μl de l'acide H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5N.

### **7 Lecture des densités optiques :**

- Lire la plaque au Spectrophotomètre

## ANNEXE II

### Matériels et réactifs

#### ❖ Matériels

- Plaque de microtitration à 96 puits Immulon 2 (Thermo Scientific, 3455)
- Pipette « multicanaux » finnpipette
- Pipetman P10, P20, P200, P1000
- Laveur de plaques
- Lecteur de plaque (Labsystemmultiscan Plus)
- Verreries (ballon, Epprouvettes, Erlenmeyer 250ml)
- Boîte de Pétri
- papiers filtres
- Lecteur de plaque
- Balance de précision

#### ❖ Réactifs

- PBS ou Phosphate Buffered Saline pH= 7,4
- Tween 20
- Caséine, Sérum Albumine Bovine (SAB), Régilait
- Conjugué anti-IgG porc marqué à la peroxydase
- Orthophénylènediamine (OPD), eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), eau distillée
- Acide sulfurique (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 2,5N

#### ❖ Solution pour le test ELISA

- Tampon de dilution de l'antigène : PBS
- Tampon de lavage : Tampon PBS-Tween
- Tampon de saturation, de sérum, de conjugué :
  - Tampon PBS Tween 20, 0.05%, régilait 1%
  - Tampon PBS Tween 20, 0,05%, caséine1%

- Tampon citrate / acide citrique, pH=5.5 stocker à +4°C
- Solution substrat - tampon citrate 12,5 ml
  - OPD 6mg
  - H2O2 15µl
- Solution d'arrêt : acide sulfurique 2.5N

*Rapport-gratuit.com*   
LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES