

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé
FACULTE DE MEDECINE

Année : 2003

Thèse N°

Thèse
pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Biologie - Science - Santé / Parasitologie

présentée et soutenue par

Bienvenue Michèle RAMANANKANDRASANA-RANDRIANARIVO

le 22 OCTOBRE 2003

Variation intraspécifique de <i>Tænia solium</i> : analyse génétique par Random Amplified Polymorphic DNA, relation avec la répartition géographique
--

Thèse dirigée par Docteur Bernard BOUTEILLE

JURY :

Monsieur le Professeur Michel DUMAS

Président

Monsieur le Professeur Stanny GEERTS

Rapporteur

Monsieur le Professeur Arturo REGGIO

Rapporteur

Monsieur le Professeur Antonino IOLI

Juge

Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU

Juge

Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE

Directeur de thèse

Remerciements

Nous exprimons notre profond respect et toute notre gratitude à Monsieur le Professeur Michel DUMAS pour nous avoir accueillis au sein de l'Institut d'Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale. Le soutien bienveillant qu'il nous a toujours porté nous honore et nous touche profondément. Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

Nous remercions Monsieur le Docteur Bernard BOUTEILLE pour avoir accepté de diriger cette thèse. Nous sommes très sensibles à la disponibilité dont il nous a témoigné et aux conseils qu'il nous a prodigués durant la réalisation de ce travail. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance.

Nous sommes très sensibles à l'honneur qu'il nous fait et nous remercions sincèrement Monsieur le Professeur Stanny GEERTS de l'attention particulière qu'il a porté à cette thèse.

Nous remercions Monsieur le Professeur Arturo REGGIO de l'honneur qu'il nous fait en acceptant de juger ce travail en mettant à notre disposition sa compétence.

Nous remercions Monsieur le Professeur Antonino IOLI pour l'honneur qu'il nous fait de participer à ce jury.

Nous exprimons nos vifs remerciements à Monsieur le Professeur Philippe VINCENDEAU. Nous sommes très sensibles à sa présence dans ce jury.

Je remercie également

Madame le Professeur Marie-Laure Dardé pour son accueil chaleureux au sein du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Limoges. Ses conseils, sa disponibilité et sa gentillesse m'ont été précieux au cours de toutes ces années de recherche.

Mesdames les Docteurs Edda Sciutto et Gladis Fragoso pour m'avoir accueillie chaleureusement au laboratoire d'Immunologie de l'"Instituto de Investigaciones Biomedicas" de l'UNAM pendant mon séjour au Mexique, et pour avoir fourni des échantillons de cysticerques nécessaires à la réalisation de cette étude.

Monsieur le Professeur Washington Benitez pour sa gentillesse et sa compréhension et pour avoir fourni des échantillons de *Taenia solium* (adulte et cysticerques).

Monsieur le Professeur Pierre-Marie Preux pour sa disponibilité, ses conseils et son aide dans la partie statistique.

Monsieur le Professeur Roger Moyou, Monsieur le Docteur Daniel Rondelaud, Monsieur le Professeur Eric Grunitzky, Monsieur le Docteur Agnon Koffi Balogou et Monsieur le Docteur Georges Nsengiyumva, pour leur collaboration dans la récolte de cysticerques.

Tous les personnels des Services Vétérinaires d'Antananarivo et de Fianarantsoa pour leur collaboration.

Rodrigo Vega, Michel Druet-Cabanac, Dismand Houinato, Macharia Waruingui, Daniel Ajzenberg et tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.

Agnès Fleury pour m'avoir fait découvrir Cuarnavaca et Taxco. Toutes mes amitiés.

Margoth Barrionuevo pour son concours dans ce travail et pour l'année inoubliable qu'on a passé ensemble.

Tous les personnels du laboratoire de Parasitologie Mycologie du CHU de Limoges pour leur aide technique, leur contribution dans la collecte d'échantillons de *Tania* et leur considérable amabilité au cours de toutes ces années de recherche.

Tous les membres de l'IENT et de l'Equipe de Recherche EA 3174 pour leur amitié et leur disponibilité.

Tous les membres du laboratoire d'Immunologie de l'"Instituto de Investigaciones Biomedicas" de l'UNAM pour leur accueil chaleureux et leur gentillesse.

Tous ceux du « Quatrième » (Laboratoire de Microbiologie) pour leur amitié. Une mention particulière pour Roselyne dont le soutien psychologique dans les moments de doute restera pour moi l'expression de la plus grande amitié.

Toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce travail

A Don et à Dominique, pour ces petits bonheurs de tous les jours qui font le grand bonheur de ma vie,

A Don sans la patience et le soutien duquel ce travail ne pourrait être réalisé,

A mes parents, qui m'ont aidé à devenir ce que je suis, pour avoir été là à tous moments,

A toute ma famille, pour leur soutien sans faille,

A mes amis.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide apportée par l'Université de Limoges (bourse BQR action internationale, réf. : RECH&VAL n°5749), le Conseil Régional du Limousin (bourse FSE/PDZR, réf. : FIN/MP/MT n° 2841) et le programme ECOS-Nord (Réf. : M99S03).

Résumé :

Taenia solium est un ver parasite de l'homme dont la larve, connue sous le nom de *Cysticercus cellulosae*, est responsable de cysticerose, maladie très fréquente dans les pays en voie de développement. La cysticerose humaine constitue un grave problème de Santé Publique dans les pays d'Afrique, d'Asie et d'Amérique Latine. Dans les pays d'Afrique et d'Asie, la cysticerose apparaît sous la forme neurologique aussi bien que sous la forme extra neurologique ; alors qu'en Amérique Latine, seules les formes neurologiques sont décrites. La neurocysticerose présente des manifestations cliniques variées dominées par l'épilepsie. Les différentes techniques de diagnostic montrent des résultats variables selon l'origine géographique des antigènes utilisés. En outre, il n'y a que très peu d'études portant sur la diversité génétique de *T. solium* et de son implication dans les manifestations cliniques de la maladie et dans le diagnostic biologique. Nous avons analysé par la technique Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) des échantillons de *T. solium* provenant de 5 pays (Burundi, Cameroun, Equateur, Madagascar et Mexique). Nous avons trouvé qu'il y a une différence génétique entre les échantillons provenant de ces différents pays. En revanche, nous n'avons pas observé de variabilité entre les cysticerques provenant de régions différentes d'un même pays, de même qu'entre les cysticerques prélevés sur un même individu. L'analyse factorielle des correspondances montre que les parasites des différents pays peuvent être répartis en deux grands groupes. Le premier groupe est composé de parasites provenant de l'Equateur, du Mexique, du Burundi et du Cameroun. Le deuxième groupe est constitué de parasites provenant de Madagascar. Le premier groupe peut être subdivisé en 3 sous groupes : Mexique/Equateur, Burundi et Cameroun. L'existence de deux groupes génétiques au sein de *T. solium* concorde avec les études déjà réalisées par des équipes japonaises sur les génotypes d'origines européenne et asiatique. En effet, il est raisonnable de supposer que, de part son histoire, les ténias provenant de Madagascar puissent avoir des origines asiatiques.

Mots clés : *Taenia solium*, Cysticerose, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), polymorphisme.

Title : Intraspecific variation of *Taenia solium* : genetic analysis by Random Amplified Polymorphic DNA, relationship with geographical distribution

Abstract :

Taenia solium is an intestinal human tapeworm. Its larval stage, known as *Cysticercus cellulosae*, was responsible for cysticercosis, a parasitic disease frequently encountered in the developing countries of Africa, Asia and Latin America. Human cysticercosis is a serious public health problem in these countries. In Africa and Asia, several clinical forms (neurologic, ocular, muscular, subcutaneous) of cysticercosis were reported whereas only neurocysticercosis was reported from Latin America. Presentations of neurocysticercosis are various and dominated by epilepsy. The different serodiagnostic assays give different results according to the geographical origin of antigens used. Besides, parasitic diversity underlying clinical manifestation and biological diagnosis are little explored. We have analyzed samples from 5 countries (Burundi, Cameroon, Ecuador, Madagascar and Mexico) by Random Amplified Polymorphic DNA. We observed genetic differences between samples from these different countries. On the other hand, there is no difference between samples within the same country, as between samples isolated from the same individual. Correspondence analysis showed two genetic groups. The first group is made up of parasites from Burundi, Cameroon, Ecuador, and Mexico. Parasites from Madagascar composed the second group. The first group can be subdivided in 3 subgroups : Mexico/Ecuador, Burundi and Cameroon. These results correlate with studies carried out by Japanese authors who have reported two genotypes of *T. solium* (European and Asian origins). Due to its history, it is reasonable to assume that *T. solium* from Madagascar could have an Asian origin.

Keywords : *Taenia solium*, Cysticercosis, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), polymorphism.

Table des matières

INTRODUCTION	15
CHAPITRE I – <i>TÆNIA SOLIUM</i> : PARASITOLOGIE, PATHOLOGIE, ÉPIDÉMIOLOGIE ET DIAGNOSTIC	17
I - <i>Tænia solium</i> / <i>Cysticercus cellulosae</i>	17
1. 1. – Classification	17
1. 2. – Parasitologie	18
1. 3. – Cycle biologique	19
1. 4. – Pathologie	20
1. 5. – Interactions hôte-parasite	22
II – <i>Tæniose</i> / <i>Cysticercose</i>	24
2. 1. – Epidémiologie	25
2. 1. 1. – Amérique Centrale et du Sud	26
2. 1. 2. – Afrique	27
2. 1. 3. – Asie.....	28
2. 1. 4. – Europe et pays industrialisés	28
2. 2. – Modes de contamination	29
2. 3. – Manifestations cliniques.....	29
2. 3. 1. – <i>Cysticercose musculaire</i>	30
2. 3. 2. – <i>Cysticercose sous-cutanée</i>	31
2. 3. 3. – <i>Neurocysticercose</i>	31
<i>Neurocysticercose et épilepsie</i>	33
2. 3. 4. – <i>Cysticercose oculaire</i>	33
2. 3. 5. – <i>Cysticercose généralisée</i>	35
2. 4. – Diagnostic.....	35
2. 4. 1. – Techniques radiologiques.....	36
2. 4. 2. – Diagnostic biologique	36
2. 4. 2. 1. – Examen anatomo-pathologique.....	36
2. 4. 2. 2. – Techniques immunologiques.....	37

2. 4. 2. 3. – Technique d’amplification de l’ADN	38
2. 5. – Traitement	39
2. 6. – Prévention – Vaccination	41
III – Travaux personnels : Diagnostic biologique et enquêtes épidémiologiques.....	44
3. 1. – Introduction	44
3. 2. – Enquêtes réalisées	45
3. 2. 1. – Au Bénin (publications 2 et 3)	45
3. 2. 2. – Au Burundi (publication 4)	47
3. 2. 3. – Au Kenya (publication 5).....	48
3. 2. 4. – A Madagascar (publication 6).....	49
 CHAPITRE II – <i>TÆNIA SOLIUM</i> / <i>CYSTICERCUS CELLULOSAE</i> : ETUDE DE LA	
BIODIVERSITÉ	51
I – Introduction.....	51
II – Généralités sur l’étude de la biodiversité.....	52
2. 1. – Méthodes	52
2. 2. – Isoélectrofocalisation	53
2. 3. – RAPD	54
2. 4. – Etudes réalisées sur la biodiversité de <i>T. solium</i>	56
III – Travaux personnels	56
3. 1. – Objectifs	56
3. 1. 1. – Objectif principal.....	56
3. 1. 2. – Objectifs secondaires.....	57
3. 2. – Etude réalisée au Mexique (publication 7).....	57
3. 2. 1 – Matériels.....	57
3. 2. 2 – Méthodes	58
3. 2. 3. – Résultats	59
3. 3. – Etude réalisée à Limoges.....	60
3. 3. 1. – Matériels.....	60
3. 3. 1. 1. – Echantillons de <i>T. solium</i>	60

3. 3. 1. 2. – Echantillons de <i>T. saginata</i>	62
3. 3. 1. 3. – Origine géographique des échantillons	62
3. 3. 2. – Méthodes	65
3. 3. 2. 1. – Isoélectrofocalisation	65
3. 3. 2. 1. 1. – Préparation des extraits de parasite	65
3. 3. 2. 1. 2. – Enzymes étudiées	65
3. 3. 2. 1. 3. – Electrophorèse	66
3. 3. 2. 1. 4. – Révélation.....	68
3. 3. 2. 2. – RAPD	68
3. 3. 2. 2. 1. – Extraction d'ADN	68
3. 3. 2. 2. 2. – Quantification de l'extrait d'ADN	69
3. 3. 2. 2. 3. – Amplification	70
3. 3. 2. 2. 4. – Electrophorèse des produits d'amplification.....	73
3. 3. 2. 2. 5. – Analyse des données	74
3. 3. 3. – Résultats	74
3. 3. 3. 1. – Isoenzymes	74
3. 3. 3. 2. – RAPD	75
3. 3. 3. 2. 1. – Reproductibilité.....	75
3. 3. 3. 2. 2. – Amorces	76
3. 3. 3. 2. 3. – Types de profils obtenus	76
3. 3. 3. 2. 4. – Effet de la calcification des cysticerques	86
3. 3. 3. 2. 5. – Relation avec la localisation anatomique	92
3. 3. 3. 2. 6. Comparaison des différents profils	98
3. 3. 3. 2. 7. Analyse factorielle des correspondances.....	104
3. 3. 4. – Interprétation et discussion.....	107
3. 3. 4. 1. – Choix des techniques.....	107
3. 3. 4. 2. – Conservation des échantillons.....	107
3. 3. 4. 3. – Isoenzymes	108
3. 3. 4. 4. – RAPD	109
3. 3. 4. 4. 1. – Diversité et localisation anatomique	109
3. 3. 4. 4. 2. –Comparaison des profils.....	110
3. 3. 4. 4. 3. – Diversité et répartition géographique.....	111

3. 4. – Notes sur les techniques utilisées à Limoges et au Mexique	113
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	114
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXES	141
<u>ANNEXE 1</u> : Protocole de prélèvement de cysticerques pour une étude de polymorphisme génétique.....	141
Protocol of sampling cysticerqui for studying genetic polymorphism.....	146
<u>ANNEXE 2</u> : Liste des échantillons analysés en RAPD	151
<u>ANNEXE 3</u> : Préparation des solutions utilisées par la technique d'IEF.....	155
<u>ANNEXE 4</u> : Préparation des gels pour IEF	157
<u>ANNEXE 5</u> : Conditions opératoires de l'IEF.....	158
<u>ANNEXE 6</u> : Solution de révélation des enzymes	159
<u>ANNEXE 7</u> : Composition des solutions stocks utilisées en RAPD	164
<u>ANNEXE 8</u> : Migration	166
<u>ANNEXE 9</u> : Préparation du MIX	167
<u>ANNEXE 10</u> : Réactifs et matériels utilisés en IEF.....	168
<u>ANNEXE 11</u> : Réactifs et matériels utilisés en RAPD	169
<u>ANNEXE 12</u> : Liste de publications et communications	170

Liste des figures

Figure 1 : Cycle biologique de *Tænia solium*.

20

Figure 2 : Cysticerose musculaire – Images radiographiques	30
Figure 3 : Cysticerose sous-cutanée	31
Figure 4 : Neurocysticerose	32
Figure 5 : Cysticerose oculaire – Localisation vitrénne	34
Figure 6 : Les différents profils obtenus par l’amorce A02	78
Figure 7 : Les différents profils obtenus par l’amorce A03	79
Figure 8 : Les différents profils obtenus par l’amorce A07	80
Figure 9 : Les différents profils obtenus par l’amorce A13	81
Figure 10 : Les différents profils obtenus par l’amorce B01	82
Figure 11 : Effet de l’état du cysticerque sur les profils obtenus par A02	87
Figure 12 : Effet de l’état du cysticerque sur les profils obtenus par A03	88
Figure 13 : Effet de l’état du cysticerque sur les profils obtenus par A07	89
Figure 14 : Effet de l’état du cysticerque sur les profils obtenus par A13	90
Figure 15 : Effet de l’état du cysticerque sur les profils obtenus par B01	91
Figure 16 : Profils obtenus par A02 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques	93
Figure 17 : Profils obtenus par A03 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques	94
Figure 18 : Profils obtenus par A07 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques	95
Figure 19 : Profils obtenus par A13 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques	96
Figure 20 : Profils obtenus par B01 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques	97
Figure 21 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l’amorce A02	99
Figure 22 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l’amorce A03	100
Figure 23 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l’amorce A07	101
Figure 24 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l’amorce A13	102
Figure 25 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l’amorce B01	103
Figure 26 : Représentation graphique de l’analyse factorielle des correspondances des échantillons de <i>Tænia solium</i>.	105

Figure 27 : Représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances des échantillons de *Tænia solium* et *T. saginata*.

Liste des tableaux

Tableau 1 : Origine des échantillons de <i>Tænia</i> spp. étudiés	64
Tableau 2 : Nature du gel et composition de la solution d'homogénéisation en fonction de l'enzyme étudiée.	67
Tableau 3 : Séquences et concentrations en MgCl₂ des amorces utilisées en RAPD	72
Tableau 4 : Type de profils trouvés par amorce chez <i>Tænia solium</i>	84
Tableau 5 : Type de profils trouvé pour chaque amorce chez <i>Tænia saginata</i>	86

Introduction

L'infection par *Tænia solium* est une maladie qui est connue depuis longtemps (Nieto, 1982 ; Webbe, 1994 ; Wadia et Singh, 2002). Les écrits sur le ver adulte remontent à 2000 ans avant J.-C. Le papyrus d'Eber montre que les égyptiens étaient déjà conscients de l'existence de parasites intestinaux dont les vers plats. Plini (25-79 ans ap. J.-C) était peut-être le premier à utiliser le terme « tænia » qui signifie bande.

L'infection du porc par les cysticerques était aussi connue des grecs. Aristote l'a appelée « rougeole du porc » (384-322 av. J.-C.). Paranolus, en 1550, était probablement le premier à rapporté la neurocysticercose humaine en mentionnant la présence de vésicules rondes, blanches remplies d'un liquide clair dans le "corpus callosum" d'un homme. En 1558, Gessner et Rumler étaient les premiers à décrire un cas de neurocysticercose chez une personne épileptique en décrivant les vésicules trouvées dans la dure mère lors d'une autopsie. Le terme « cysticercus » (du grec *cystis* signifiant vésicule et *cercos* qui signifie queue) a été utilisé pour la première fois par Zeder (1800). En 1809, pensant que les cysticerques faisaient partie d'une espèce indépendante, Karl Asmund Rudolphi les a nommés *Cysticercus cellulosae* en raison de leur grande affinité pour les tissus conjonctifs.

C'est Benden, en 1853, qui a été le premier à suspecter le lien entre les cysticerques et *Tænia* mais ce fut Freidrich Küchenmeister en 1855 qui a apporté la preuve que *Cysticercus cellulosae* est la forme larvaire de *T. solium* en faisant ingérer à un prisonnier condamné des cysticerques prélevés sur un porc ladre et en retrouvant dans son intestin, après sa mort, un ténia adulte.

En 1860, Virchow décrivait ce qu'on appelle actuellement la forme racémeuse de la neurocysticercose. En 1862, Griesenger, un psychiatre allemand, avait écrit un compte-rendu sur la neurocysticercose. En se basant sur son expérience personnelle et sur la recherche dans la littérature, il avait établi une classification clinique. Le premier groupe était composé de cas asymptomatiques : présence de cysticerques dans le cerveau sans autre symptôme lié à leur présence. Le deuxième groupe présentait des crises d'épilepsie sans manifestation

psychiatrique ni d'aucun autre type. Le troisième groupe souffrait d'épilepsie avec des troubles mentaux marqués comme psychose maniaco-dépressive, formes variées de délire, confusion, « affective dulling », et démence. Le quatrième groupe comprenait les personnes avec des troubles mentaux chroniques distincts sans épilepsie ; et le cinquième groupe des patients qui présentaient des symptômes d'irritation cérébrale diffuse ou torpeur, mais ne montraient pas de trouble mental ou d'épilepsie.

Cobbold (1864) apparaissait comme étant le premier à attirer l'attention du danger de l'infection humaine résultant de l'ingestion d'œufs de ténia. Il a attiré l'attention sur le fait que les œufs de *T. solium* peuvent être transmis à l'homme par l'eau ou les mouches.

CHAPITRE I – *Tænia solium* : parasitologie, pathologie, épidémiologie et diagnostic

I - *Tænia solium* / *Cysticercus cellulosae*

1. 1. – Classification

Tænia solium Linnaeus, 1758 est un métazoaire, triploblastique, acœlomate. Il fait partie de l'embranchement des Plathelminthes.

Ce sont des vers à corps long aplati, à symétrie bilatérale dont les différents organes sont inclus au sein d'un tissu mésenchymateux. Ils n'ont pas d'appareil circulatoire, ni d'appareil respiratoire. Leur appareil excréteur est constitué de cellules à flammes vibratiles (ou solénocytes). Ils sont hermaphrodites. L'appareil mâle comporte des testicules en nombre variable (1 à plusieurs centaines), prolongés par un canal conduisant au canal déférent, de vésicule séminale, de canal éjaculateur aboutissant au cirre (organe copulateur) puis à la poche du cirre et s'ouvrant dans un atrium génital. L'appareil femelle comporte un ovaire souvent bilobé, prolongé par un oviducte, des glandes vitellogènes et un utérus. Les deux appareils débouchent dans l'atrium génital dont l'ouverture est le pore génital.

Il appartient à la classe des Cestoïdea qui comprend des parasites dépourvus de tube digestif et à corps segmenté, et à la sous-classe des Eucestoda possédant des organes de fixation (scolex).

Les représentants des espèces de l'ordre des Cyclophyllidea ont une tête globuleuse appelée scolex, muni de quatre ventouses. Ils peuvent présenter ou non des crochets. Ils ont

des pores génitaux latéraux mais ne possèdent pas de pore utérin. Les œufs sont non operculés et contiennent un embryon avec trois paires de crochets (embryon hexacanthé). Leur cycle de vie est exclusivement terrestre.

La famille des Taeniidae à laquelle appartient *T. solium* est caractérisée par des parasites dont les crochets en forme de poignard ont trois éléments constitutifs : le manche, la lame et la garde.

1. 2. – Parasitologie

Taenia solium est un ver parasite de l'intestin grêle de l'homme communément appelé « ver solitaire ». Cette appellation englobe à la fois *T. solium* et *T. saginata*, un autre parasite de l'intestin humain, très voisin morphologiquement.

T. solium est un ver plat, de 1 à 8 mètres de long. Il est constitué d'une tête (scolex), d'un cou allongé et d'un corps (strobile). Le scolex est accroché à l'intestin au niveau du jéjunum et le corps s'étend tout au long de l'iléum. Le scolex mesure approximativement 1 mm de diamètre ; il est muni de 4 ventouses et d'un rostre proéminent portant deux couronnes de crochets. Il possède 22 à 36 crochets avec alternance de gros crochets (160-180 µm) et de petits crochets (110-140 µm). La forme des crochets est caractéristique de la famille de *Taeniidae*. Le cou est étroit et n'est pas segmenté. C'est une zone de croissance. Le strobile est formé par un processus de « bourgeonnement » à partir du cou. Il est constitué de 700 à 1000 segments successifs alignés, appelés proglottis ou anneaux, et peut être extrêmement long. Les proglottis diffèrent en taille, forme, étape de développement des organes de reproduction internes, et teneur en œufs. Les proglottis les plus proches du cou sont immatures et sont sexuellement indifférenciés. Ils sont plus larges que longs. Ceux de la partie moyenne, en forme de carré, contiennent un appareil reproducteur complet. Enfin, ceux de la partie postérieure sont ovigères ou gravides et contiennent des milliers d'œufs. Ils sont plus longs que larges. Les derniers proglottis gravides se détachent et sont éliminés régulièrement et passivement en courte chaîne dans le milieu extérieur avec les fèces.

1. 3. – Cycle biologique

La figure 1 montre le schéma du cycle biologique de *T. solium*. L'homme est l'hôte définitif de *T. solium* c'est-à-dire qu'il héberge le ver adulte. En déféquant dans la nature, l'homme dissémine les œufs dans l'environnement. Le porc – hôte intermédiaire c'est-à-dire qu'il héberge le stade larvaire – s'infecte en ingérant les proglottis gravidés contenus dans les fèces humaines. Les oncosphères – libérées de la paroi des embryophores par les sécrétions gastriques – traversent la paroi intestinale et passent dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. Ces embryons sont ensuite transportés dans les muscles par la circulation où ils se développent sous forme de vésicules. Ils atteignent leur développement complet deux mois après ingestion des œufs : c'est la cysticercose. L'homme s'infecte en mangeant de la viande de porc ladre crue ou insuffisamment cuite. Le scolex s'évagine de la vésicule et s'accroche à l'intestin. Le ver adulte se développe à partir du scolex du cysticerque et devient mature, capable de se reproduire en 5 à 12 semaines : c'est la téniose.

Bien que l'homme soit le seul hôte définitif de *T. solium*, le parasite se développe expérimentalement chez le hamster (Allan *et al.*, 1991), le chinchilla (Maravilla *et al.*, 1998), ou encore la souris NOD-scid (Ito *et al.*, 2001). Le stade larvaire (*C. cellulosae*) se développe essentiellement chez le porc mais des cas ont été rapportés chez l'ours (Theis *et al.*, 1996), le phoque (De Graaf *et al.*, 1980), et divers mammifères. En Asie, le chien est une alternative comme hôte intermédiaire et contribue à entretenir le cycle biologique du parasite du fait que certaines tribus en mangent la viande (Ito *et al.*, 2002).

Les œufs sont aussi infectant pour l'homme, se substituant ainsi au porc et devenant hôte intermédiaire : c'est la cysticercose humaine.

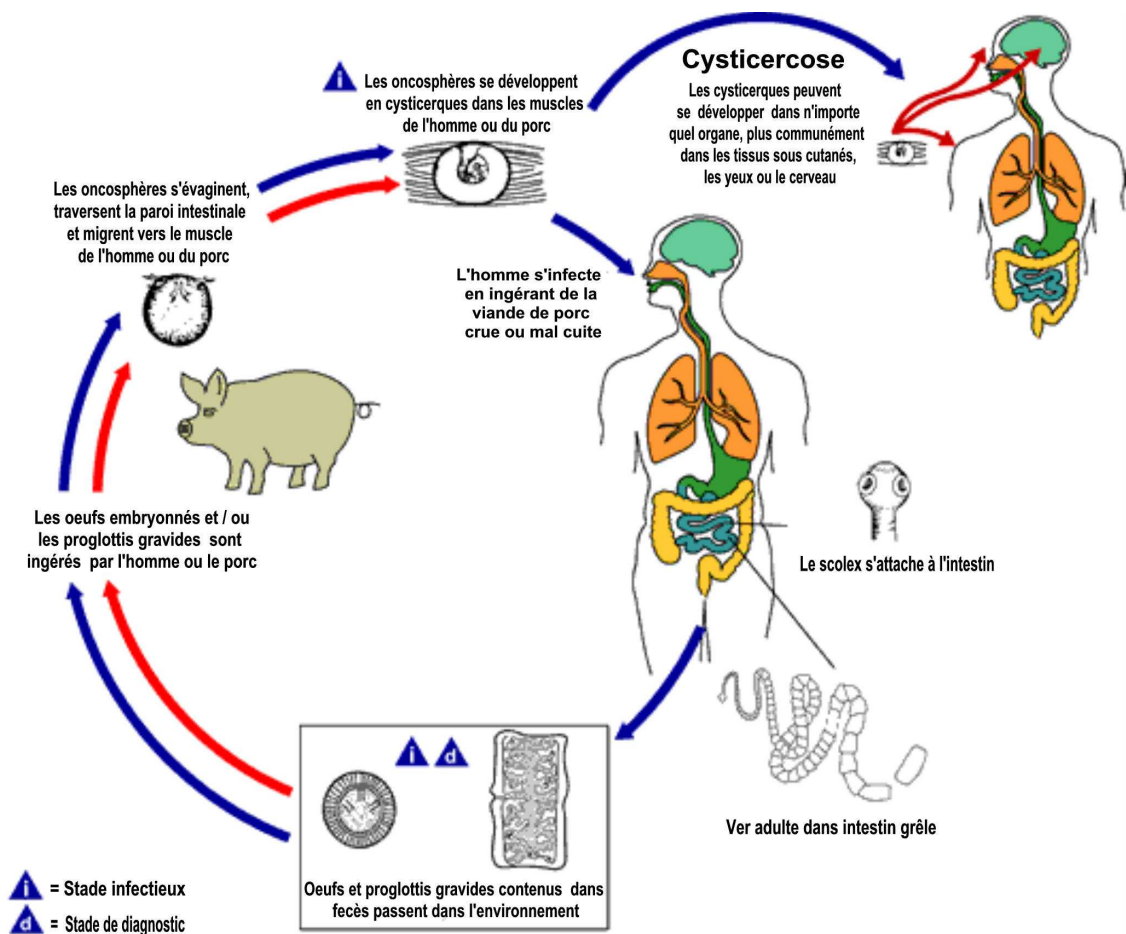


Figure 1 : Cycle biologique de *Taenia solium*.

(Source : "DPDx: CDC's Web site for parasitology identification" : <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Cysticercosis.htm>).

1. 4. – Pathologie

La cysticercose humaine peut générer chez le sujet infecté divers troubles. La pathogénicité des cysticerques est liée à leur localisation et la gravité des manifestations peut dépendre de leur nombre.

Le cysticerque se présente dans les tissus comme un kyste, rempli de liquide, à paroi mince et translucide. Le scolex est invaginé et apparaît comme un nodule opaque excentré. La

taille et la forme du kyste varient en fonction de la pression du tissu environnant. Dans le muscle, le cysticerque vivant apparaît comme un kyste ovale. Dans le cerveau, les kystes sont ronds mesurant environ 1 cm de diamètre et peuvent être entourés d'une capsule d'épaisseur variable composée d'astrocytes et de fibres de collagène ; mais la capsule est généralement de faible épaisseur pour les localisations nerveuse et oculaire. La paroi du kyste est constituée de trois couches : une couche cuticulaire externe, une couche cellulaire médiane, et une couche réticulaire interne. Le nodule contient un scolex invaginé (protoscolex), de 4 à 5 mm de long, et qui a une structure similaire au ver adulte (quatre ventouses et un rostre proéminent avec des crochets). Le protoscolex est relié au kyste par le cou et un canal spiral dont la membrane est aussi trilaminaire. Un petit pore excrétoire situé près de l'extrémité du canal spiral relie le canal digestif au tissu environnant.

Pour accomplir son cycle biologique, le cysticerque doit survivre dans le tissu de son hôte plusieurs semaines voire des mois. Pour cela, il a développé des mécanismes élaborés pour échapper aux réponses de l'hôte. Selon que la tolérance immunitaire de l'hôte est forte ou faible, le cysticerque évolue plus ou moins lentement vers la mort (calcification). Morphologiquement, on distingue quatre étapes de développement et de régression du cysticerque (Escobar et Weidenheim, 2002) :

- stade vésiculaire où le cysticerque est viable, la paroi est mince et translucide. Le scolex est visible sur le côté. Ce stade n'engendre que peu de réponse inflammatoire de la part de l'hôte.

- stade colloïdal correspondant à la nécrose du parasite associée à un processus inflammatoire. Le cysticerque nécrotique apparaît comme une structure de polynucléaires éosinophiles dans laquelle les composants de la vésicule et du scolex, dans divers stades de désintégration, sont identifiables.

- stade nodulaire granulaire : le kyste se rétracte. Son contenu se minéralise et tend à apparaître granulaire. La larve devient fragmentée mais un examen histologique minutieux permet d'identifier les parties restantes de la membrane et du scolex. La technique trichrome de Masson permet de les différencier. Avec cette coloration, la membrane apparaît rouge vif alors que le scolex est rouge teinté de bleu à cause du tissu de collagène. La capsule de

collagène autour du kyste est épaisse, colorée en bleu foncé. Elle est entourée et infiltrée de neutrophiles et d'éosinophiles.

- stade nodulaire calcifié : le matériel granulaire du stade précédent devient complètement minéralisé. Le cysticerque nodulaire calcifié est petit, d'environ le tiers ou le quart de la taille du cysticerque vésiculaire. Dans le muscle, le kyste mort peut se collaber par la pression des tissus environnants et se calcifier sous forme d'épingle. La capsule fibreuse du cysticerque lui donne une consistance dure. Lorsqu'il est sectionné, la surface exposée apparaît blanchâtre mais peut aussi être hétérogène et de couleur jaune-marron. L'infiltrat inflammatoire aux alentours est minimal ou absent.

Les cysticerques ont été observés dans tous les organes. Chez l'homme, ils sont plus souvent localisés dans les tissus sous-cutanés, les muscles, l'œil, et le cerveau. Sauf en cas de localisation cérébrale et oculaire, l'infection est habituellement bénigne. La neurocysticercose – localisation des cysticerques dans le cerveau – est actuellement considérée comme étant la principale cause des maladies neurologiques dans le monde (White, 1997). Sotelo *et al.* (1985) ont classé la neurocysticercose en forme active et forme inactive selon la nature de la maladie. Les formes actives sont l'arachnoïdite, l'hydrocéphalie secondaire à une inflammation du méninge, les kystes parenchymateux, l'infarctus cérébral secondaire à une vascularite, l'effet de masse due à des kystes larges ou en grappe, les kystes intraventriculaires, ainsi que les kystes spinaux. Les formes inactives regroupent les calcifications parenchymateuses et l'hydrocéphalie secondaire à une fibrose méningée.

1. 5. – Interactions hôte-parasite

Les mécanismes de pénétration des oncosphères de *T. solium* dans l'organisme ne sont que peu étudiés, mais une idée du processus peut être évoquée à partir des études réalisées avec les autres helminthes. Chez *Hymenolepis nana*, les oncosphères se servent de certaines protéases en plus des trois paires de crochets pour envahir les tissus de l'hôte. Chez *H. diminuta*, une activité sérine protéase a été isolée dans les glandes de pénétration. De même,

des peptidases de sécrétion ont été trouvées dans les glandes de pénétration de *T. saginata*. Outre leurs fonctions nutritionnelles, ces enzymes participent à l'invasion du tissu (Molinari et Tato, 2002).

L'infection par les œufs de *T. solium* induit des réponses immunologiques humorales chez l'homme. Plusieurs classes d'immunoglobines (Ig) sont produites. La plus fréquente est l'Ig G qui peut être détectée dans le sérum, le LCR et la salive. La réponse en anticorps est proportionnelle à l'intensité et à la durée de l'infection (Flisser *et al.*, 2002). Des études réalisées *in vitro* ont montré que les oncosphères étaient détruites par les sérums de patients souffrant de neurocysticercose après addition de complément (Molinari *et al.*, 1993a). Chez les animaux immuns, la destruction des oncosphères fait appel à la voie classique du complément. Mais chez l'hôte susceptible, les oncosphères sont capables de moduler l'activation du complément (White *et al.*, 1997). Une infection aiguë avec des oncosphères de *T. solium* est donc associée à une baisse de la réponse immune de l'hôte.

Les oncosphères qui arrivent à échapper aux actions des anticorps et du complément vont se développer en métacestodes qui sont résistants à l'action du complément. Les métacestodes survivent dans les tissus de l'hôte en déjouant et en modulant l'immunité de ce dernier. Il s'établit alors un « équilibre » entre le métacestode vivant et son hôte (Flisser *et al.*, 2002).

Le métacestode utilise différents mécanismes pour se soustraire à la réponse immune de l'hôte (Flisser *et al.*, 2002) :

- localisation des parasites dans des sites privilégiés immunologiquement : les cysticerques se développent et persistent mieux dans l'œil et le cerveau que dans d'autres tissus ou organes.

- dissimulation des antigènes du cysticerque par les immunoglobulines de l'hôte : les cysticerques présentent à leur surface des Ig de l'hôte.

- immunité concomitante : une infection antérieure protège contre une nouvelle infection. On peut présumer que les cysticerques complètement développés peuvent exprimer des antigènes différents de ceux des cysticerques en voie de développement, capables de résister plus efficacement aux réponses immunes de l'hôte.

- mimétisme moléculaire : le parasite synthétise des antigènes similaires à ceux de l'hôte.

- suppression ou déviation de la réponse de l'hôte.

Les métacestodes utilisent les Ig secrétées par l'hôte comme source d'acides aminés pour fabriquer les protéines de structure. La digestion de ces Ig se fait par l'action d'enzymes, en particulier la cystéine protéase, situées dans la paroi du kyste. D'autres enzymes telles que la glutathion S-transférase, la glutathion réductase, la glutathion peroxydase et la superoxyde dismutase sont impliquées dans la détoxification des radicaux libres (White *et al.*, 1997). Une autre molécule intervenant dans la modulation de l'immunité de l'hôte par les métacestodes est la MF (« Metacestode Factor »). C'est une molécule, sécrétée par les métacestodes, RNA-like, de poids moléculaire inférieur à 3500 daltons (Da) (Molinari et Tato, 2002). Elle inhibe les réponses immunes humorale et cellulaire, ainsi que la réaction inflammatoire autour des métacestodes. Des expériences effectuées *in vitro* montrent qu'elle inhibe aussi la production d'interféron- γ (IFN- γ), d'interleukine 2 (IL-2) et d'interleukine 4 (IL-4) (Molinari et Tato, 2002). De même, la prostaglandine E₂ (PE₂) inhibe la production de cytokines par les cellules Th 1 (Katamura *et al.*, 1995).

Les hormones sexuelles semblent être impliquées dans la susceptibilité ou la résistance à l'infection (Morales *et al.*, 2002). Chez *T. crassiceps*, la gonadectomie augmente la charge parasitaire chez la souris mâle alors qu'elle décroît chez la souris femelle. L'effet d'androgènes ou d'œstrogènes sur les parasites n'est pas direct puisque la supplémentation hormonale n'affecte pas la croissance *in vitro* des parasites (Huerta *et al.*, 1992).

II – Tæniose / Cysticercose

La tæniose est une infection due à *T. solium* adulte. L'homme est le seul hôte définitif qui puisse héberger le ver adulte dans son intestin.

La cysticerose est une maladie parasitaire due à *Cysticercus cellulosae*, stade larvaire de *Taenia solium*. C'est une maladie très répandue dans les pays en voie de développement et qui ressurgit dans les pays industrialisés en raison de la facilité des voyages intercontinentaux et de l'augmentation des migrants provenant des pays endémiques (Sciutto *et al.*, 2000).

2. 1. – Epidémiologie

Les études concernant la prévalence de la téniose ont été « handicapées » en raison de l'inexistence de techniques de dépistage spécifiques, sensibles et bon marché. Les méthodes conventionnelles pour évaluer la prévalence de téniose comportent l'interrogation des individus afin de savoir s'ils ont observé la présence de proglottis dans les selles, et l'examen parasitologique des selles pour la recherche d'œufs, d'embryophores ou de proglottis de ténia. Toutefois, ces méthodes ne procurent pas une estimation précise de l'infection parasitaire car l'émission des proglottis passe souvent inaperçue et la différenciation des œufs de *T. solium* et de *T. saginata* est difficile à l'examen microscopique. Au Nigeria, on a rapporté une prévalence de 8,6 % de téniose par l'examen parasitologique des selles sans distinction d'espèce (Onah & Chiejina, 1995). Au Cameroun, une prévalence de 0,13 % de téniose humaine a été rapportée (Nguekam *et al.*, 2003). En Indonésie, la prévalence de la téniose varie entre 0,4 % et 42,7 % (Simanjuntak *et al.*, 1997).

En 1988, Fan a décrit un ténia similaire à *T. saginata* mais de taille plus petite et dont le stade larvaire présente un scolex avec un rostre portant des crochets lui faisant ressembler à celui de *T. solium*. Par ailleurs, la larve de ce ténia parasite le porc et non le bœuf et a une préférence pour une localisation hépatique. La caractérisation génétique de ce ténia suggère que c'est une sous-espèce de *T. saginata* (*T. saginata asiatica*) et non une nouvelle espèce (Bowles & McManus, 1994). La prédominance de ce ténia dans l'île de Cheju en Corée et les résultats d'une étude de prévalence de la neurocysticerose chez les patients épileptiques réalisée dans l'île montrant le taux de positivité le plus élevé en anticorps anti-cysticerques de toute la Corée, associée aux habitudes alimentaires des indigènes à manger de la viande de

porc crue en particulier le foie, soulève la question de savoir si ce ténia est capable de causer une cysticercose humaine (Galán-Puchades & Fuentes, 2001).

La cysticercose atteint les deux sexes ; elle est observée à tout âge y compris chez les nourrissons. Avant les années 90, les données fiables concernant la prévalence de la cysticercose sont limitées. Le développement des technologies d'imagerie médicale et l'amélioration des techniques d'analyse sérologique ont montré que la cysticercose est un important problème de Santé Publique mais qu'elle est encore méconnue (Tsang & Wilson, 1995 ; Sciutto *et al.*, 2000 ; Geerts *et al.*, 2002).

La distribution géographique de la cysticercose est large. Elle couvre pratiquement tous les pays en voie de développement, en particulier ceux qui élèvent le porc et en consomment la viande.

2. 1. 1. – Amérique Centrale et du Sud

En Amérique Latine, elle a été rapportée au Mexique (Sarti *et al.*, 1994 ; Rodriguez-Canul *et al.*, 1999), au Guatemala (Garcia-Noval *et al.*, 1996), en Equateur (Levav *et al.*, 1995 ; Cruz *et al.*, 1999), en Honduras (Sanchez *et al.*, 1998), en Bolivie (Carrique-Mas *et al.*, 2001), au Pérou (Garcia *et al.*, 1999), au Brésil (Agapejev, 2002). La séroprévalence de la cysticercose humaine est estimée à environ 10 % au Mexique (Sarti, 2002), de 10 à 34 % en Amérique Centrale (Garcia-Noval *et al.*, 2002). Au Pérou, la séroprévalence de la cysticercose humaine varie de 8 à 24 % et celle de la cysticercose porcine de 13 à 49 % (Garcia *et al.*, 2002b). Dans l'état de São Paulo au Brésil, la neurocysticercose est responsable de 13 % des admissions dans les services de neurologie et de neurochirurgie (Agapejev, 2002).

2. 1. 2. – Afrique

En Afrique, des cas de cysticerose ont été rapportés au Sénégal (Dumas *et al.*, 1976), au Bénin (Avodé *et al.*, 1994 ; Adjidé *et al.*, 1996), en Côte d'Ivoire (Giordano *et al.*, 1976), au Togo (Dumas *et al.*, 1990 ; Grunitzky *et al.*, 1995), au Ghana (Odamtten & Laing, 1967), au Burkina Faso (Preux *et al.*, 1996), au Nigeria (Onah & Chiejina, 1995), dans la République Démocratique du Congo (Lelo *et al.*, 1992), au Cameroun (Marty *et al.*, 1985), au Burundi (Aubry *et al.*, 1990), au Kenya (Ruberti *et al.*, 1985), au Rwanda (Vanderick & Moboryingabo 1972 ; Gascon *et al.*, 1989), en Tanzanie, en Ouganda (Preux *et al.*, 1996), au Mozambique (Vilhena *et al.*, 1999), au Zimbabwe (Gelfand, 1948 ; Mason *et al.*, 1992), en Afrique du Sud (Tuch & Saffer, 1984 ; Shasha *et al.*, 1986 ; Zini *et al.*, 1990 ; Sacks & Berkowitz, 1990). Dans l'Océan Indien, des cas ont été rapportés à Madagascar (Andrianjafy, 1910 ; Andriamiandra *et al.*, 1969, Rajaonarison *et al.*, 2001) et à l'île de La Réunion (Jay & Petithorry, 1974 ; Maldonado, 1985 ; Chamouillet *et al.*, 1997). Une étude séroépidémiologique dans 6 départements du Bénin a montré une prévalence de 1,3 % (Houinato *et al.*, 1998). Au Burundi, une étude faite par Newell *et al.* (1997) sur une population d'épileptiques et les membres de leurs familles a montré que 4,9 % des épileptiques et 4,2 % des non épileptiques présentent des antigènes de *T. solium* ; alors que 11,7 % des épileptiques et 2,8 % des contrôles présentent des anticorps anti-*T. solium*. Au Cameroun, on a rapporté des séroprévalences de 2,4 % et de 11,0 % pour respectivement la cysticerose humaine et la cysticerose porcine (Nguekam *et al.*, 2003). Dans deux zones rurales du Transkei en Afrique du Sud, une séroprévalence de 5,5 % a été rapportée chez des écoliers (Shasha & Pammenter, 1991). En Afrique sub-Saharienne, la prévalence de la cysticerose varie de 0,23 à 24,0 % (Druet-Cabanac *et al.*, 2002).

En Zambie, il n'y a pas de données concernant la prévalence de la cysticerose humaine. Toutefois, Phiri *et al.* (2002) ont rapporté une prévalence allant de 9,3 à 20,8 % pour la cysticerose porcine à l'abattoir de Lusaka. De plus, comme dans la plupart des pays touchés par cette maladie, la pratique de l'élevage des porcs en milieu clos est faible, l'inspection et le contrôle de la viande sont pratiquement inexistantes, la population n'a qu'une faible connaissance de la maladie, et les installations sanitaires sont rares. Ceci fait suspecter la présence de porteurs de *T. solium* adulte et un risque élevé de cysticerose humaine.

2. 1. 3. – Asie

On sait que l'infection existe en Indonésie, en Inde, au Vietnam, au Cambodge, au Laos, au Thaïlande, en Corée, en Chine, au Népal, en Mongolie, aux Philippines, au Myanmar (Singh *et al.*, 2002). En Chine, l'étude séroépidémiologique sur la cysticercose à *T. solium* réalisée dans le province de Shandong fait état de 3,2 % de prévalence (Cao *et al.*, 1996). En Indonésie, Sutisna *et al.* (1999) a rapporté une prévalence de 0,72 % de tœniose et 1,65 % de cysticercose humaine lors d'une étude réalisée à Bali. Dans une étude réalisée dans un village au nord du Vietnam, la recherche d'antigène circulant de *T. solium* s'est révélée positive pour 21 personnes sur 210 (Erhart *et al.*, 2002).

2. 1. 4. – Europe et pays industrialisés

A l'exception de quelques pays de l'Europe de l'Est, la cysticercose a été éradiquée en Europe au début du XX^{ième} siècle. Mais la généralisation des voyages internationaux, la facilité des moyens de transport, et l'augmentation constante des migrants des pays endémiques vers les pays occidentaux font que cette parasitose se rencontre plus fréquemment dans les pays développés.

Au Portugal, Monteiro *et al.* (1987) ont rapporté 138 cas de neurocysticercose diagnostiqués par scanographie cérébrale entre novembre 1982 et juin 1986.

Par ailleurs, le nombre de cas de cysticercose chez les personnes ayant voyagé dans les pays d'endémicité est de plus en plus élevé (Hansen *et al.*, 1992 ; Sorvillo *et al.*, 1992 ; Chatel *et al.*, 1999). Aux Etats-Unis, au cours des dernières décennies, la neurocysticercose est devenue un important problème de Santé Publique à cause de l'afflux croissant d'immigrés. La plupart des cas survient chez les immigrants hispaniques de l'Amérique Latine, en particulier du Mexique (Earnest *et al.*, 1987). Par ailleurs, des cas ont été rapportés chez des

personnes qui n'ont jamais voyagé (CDC, 1992), ou qui ne consomment pas de viande de porc (Schantz *et al.*, 1992). L'emploi répandu de personnel de maison provenant des régions endémiques et le taux de renouvellement élevé de ces employés ont été identifiés comme étant le facteur majeur de ces transmissions locales (Moore *et al.*, 1995).

2. 2. – Modes de contamination

L'homme contracte la téniose en mangeant de la viande de porc ladre crue ou mal cuite. Le parasite se développe dans son intestin et devient adulte en quelques semaines.

Deux modes de contamination ont été évoqués pour la cysticercose humaine :

- Contamination par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (péris fécal) par des œufs de *T. solium* disséminés dans la nature par un autre humain porteur du ver adulte. La présence de porteur de *T. solium* adulte dans l'entourage est un facteur de risque important.

- Contamination par auto-infection à partir des œufs embryonnés produits par le ténia hébergé par le sujet lui-même. Cela peut survenir par souillure fécale (mains sales), mais aussi par digestion d'anneaux remontant de l'intestin grêle dans l'estomac suite à des mouvements intestinaux antipéristaltiques. Dans ce cas, la téniose précède la cysticercose et la contamination initiale est due à la consommation de viande de porc ladre.

2. 3. – Manifestations cliniques

La téniose est une infection sans gravité qui passe souvent inaperçue. Les manifestations cliniques peuvent revêtir les aspects les plus divers surtout chez les enfants. Les signes cliniques peuvent être de nature digestive ou non. Parmi les signes digestifs, on observe la boulimie ou l'anorexie, la sialorrhée, une éructation, des nausées ou des

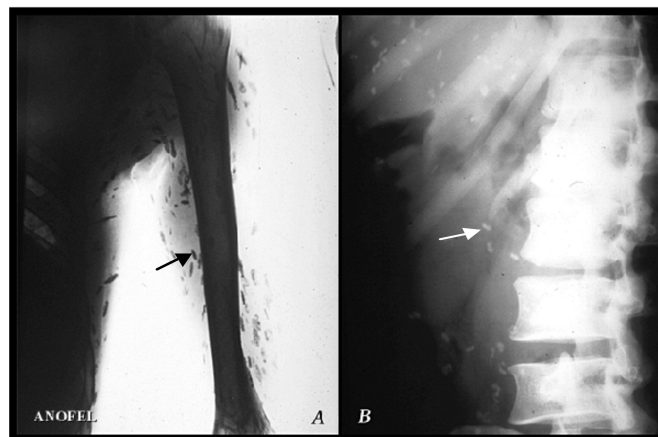
vomissements, des douleurs abdominales d'intensité variable plus ou moins bien localisées, ou encore de troubles du transit avec alternance de diarrhée et de constipation. Les complications intestinales sont rares. Les signes extra-digestifs sont polymorphes.

Les manifestations cliniques de la cysticercose sont variables et sont déterminées par plusieurs facteurs : le nombre de cysticerques, la localisation des parasites, la forme du cysticerque impliqué (*C. cellulosae* ou *C. racemosus*), l'étape de développement du parasite, et l'intensité de la réponse immunitaire / inflammatoire de l'hôte.

2. 3. 1. – Cysticercose musculaire

C'est la localisation des cysticerques dans le muscle strié. Elle est le plus souvent asymptomatique mais parfois on peut observer des myalgies ou un tableau de myosite avec douleurs et œdème musculaire. Elle évolue spontanément vers la calcification. Le diagnostic est alors le plus souvent le fait du hasard à l'occasion d'une radiographie.

Figure 2 : Cysticercose musculaire – Images radiographiques

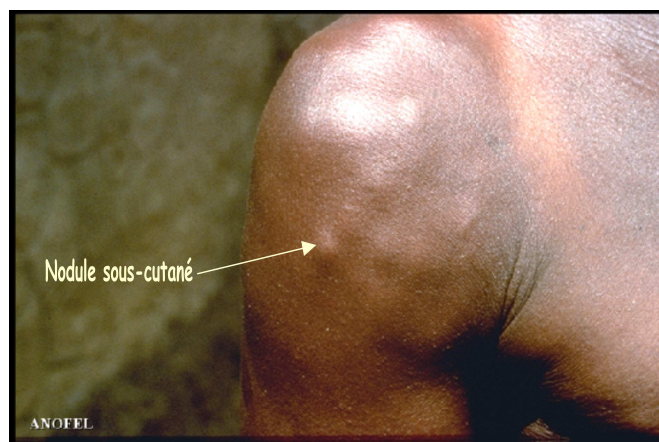


Les flèches montrent les cysticerques calcifiés dans le muscle

2. 3. 2. – Cysticerose sous-cutanée

L'atteinte sous-cutanée est caractérisée par la présence de nodule parasitaire, peu adhérent au tissu adjacent, peu mobile, indolore et siégeant préférentiellement sur le thorax ou le dos. Le diagnostic se fait par identification du parasite après biopsie du nodule.

Figure 3 : Cysticerose sous-cutanée



2. 3. 3. – Neurocysticerose

C'est la localisation des cysticerques dans le système nerveux. Elle constitue la forme la plus grave de la maladie. Les cysticerques se rencontrent généralement dans le parenchyme (Del Brutto, 1995 ; Monteiro *et al.*, 1995 ; Dumas *et al.*, 1997), dans les espaces sous-arachnoïdiens (Sotelo & Marin, 1987), ou dans les cavités ventriculaires (Cuetter *et al.*, 1997). Dans le parenchyme, le parasite est habituellement localisé dans le cortex et dans la jonction de la substance grise et de la substance blanche. L'infection dans les ganglions basaux, les pédoncules cérébraux, ou le cervelet est moins fréquente. La localisation intramédullaire (Carydakis *et al.*, 1984 ; Dietemann *et al.*, 1985 ; Isidro-Llorens *et al.*, 1993) et les atteintes du système nerveux périphérique (Parker *et al.*, 1988) sont rares. Parmi les cavités ventriculaires,

le IV^{ième} ventricule et les ventricules latéraux sont les zones les plus fréquemment affectées. Il peut aussi exister des formes mixtes.

La forme larvaire connue sous le nom de *C. racemosus*, désignation proposée par Zenker en 1882 (du latin *racemus*, qui signifie grappe), se rencontre moins fréquemment. Dans cette forme racémeuse, les kystes sont plus larges (4 à 12 cm) que ceux de *C. cellulosae*, et le scolex est absent. Cette forme peut apparaître comme un kyste unique ou, plus fréquemment, comme des kystes de taille variable arrangés en « grappe de raisin ». La forme racémeuse se situe préférentiellement dans les citernes basales, la fissure sylvienne et les cavités ventriculaires. La coexistence de *C. cellulosae* et *C. racemosus* a été observée dans environ 10 % de cas de neurocysticercose (Rabiela-Cervantes *et al.*, 1985).

Figure 4 : Neurocysticercose



Il n'y a pas de symptomatologie typique permettant de caractériser cette parasitose. La symptomatologie peut aller d'un trouble neurologique discret au trouble cérébral le plus dramatique. Les manifestations cliniques sont dominées, par ordre de fréquence décroissante, par les crises épileptiques (Sotelo *et al.*, 1985 ; Gang-zhi *et al.*, 1988 ; Monteiro *et al.*, 1995), les céphalées (Cruz *et al.*, 1995), les signes d'hypertension intracrânienne, l'hydrocéphalie et ses complications (Sotelo & Marin, 1987). Mais elle peut aussi entraîner la démence ou même la mort. Les formes asymptomatiques représentent 3% des cas.

La neurocysticercose est l'une des maladies émergentes et re-émergentes les plus graves dans le monde. L'OMS estime qu'environ 50 000 personnes par an en meurent (Ito, 2002). Elle est une des causes les plus fréquentes de l'épilepsie dans les pays en voie de développement (Garcia *et al.*, 1993 ; Andriantsimahavandy *et al.*, 1997). Tout type de crise a été observé mais les crises généralisées d'emblée et les crises partielles secondairement généralisées prédominent (Sotelo *et al.*, 1985).

Neurocysticercose et épilepsie

Dans les pays en voie de développement, la neurocysticercose est l'une des causes les plus fréquentes des épilepsies (Garcia *et al.*, 1993 ; Andriantsimahavandy *et al.*, 1997). En Afrique du Sud, on a rapporté que 50,9 % des patients épileptiques présentent une neurocysticercose (Campbell & Farrell, 1987). Lors d'une étude épidémiologique réalisée dans le nord du Togo, Dumas *et al.* (1990) ont rapporté que la neurocysticercose est cause d'épilepsie chez 29,5 % des patients, tout âge confondu ; et qu'au-delà de 50 ans, elle est à l'origine de 66 % des épilepsies. A Madagascar, 17,6 % des enfants présentant une épilepsie sans étiologie montrent une sérologie positive pour la recherche d'anticorps dirigés contre *T. solium* (Grill *et al.*, 1996). En Amérique Latine, la neurocysticercose est la cause principale d'épilepsie retrouvée chez 30 à 50 % des patients (Carpio & Hauser, 2002). En Inde, la neurocysticercose est impliquée dans 10 à 20 % de cas d'épilepsie (Singh, 1997). En Irian Jaya, on a observé une augmentation de cas de brûlures résultant de crises d'épilepsie probablement causées par la neurocysticercose (Simanjuntak *et al.*, 1997).

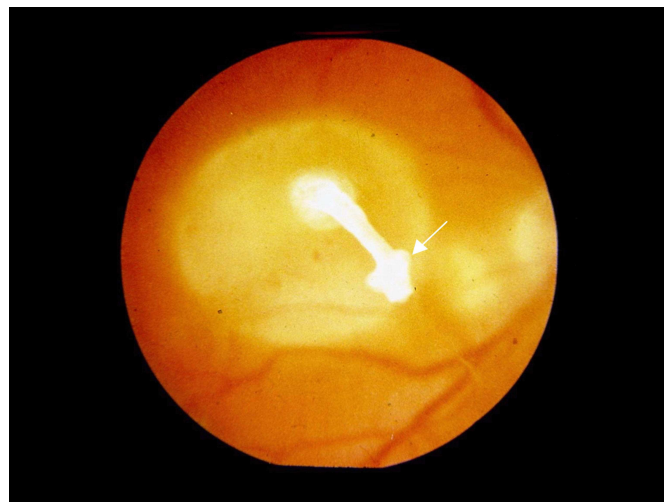
2. 3. 4. – Cysticercose oculaire

Le cysticerque peut se rencontrer soit au niveau des annexes, paupières, conjonctives, orbites (20 à 25% des cas), soit de façon plus fréquente au niveau du globe oculaire (75 à 80%

des cas) (Auzemery *et al.*, 1995). La localisation vitrénne est la plus fréquente des atteintes du globe oculaire (Saliou *et al.*, 1984 ; Auzemery *et al.*, 1996). En l'absence de traitement, l'évolution se fait vers des complications inflammatoires majeures entraînant cataracte, hypertonie, glaucome, décollement rétinien. La localisation sous-rétinienne est l'une des formes les plus fréquentes de la localisation intra-oculaire. La localisation du kyste au pôle postérieur entraîne une baisse d'acuité visuelle. A proximité du pôle postérieur, il entraîne un décollement de la macula ou un œdème maculaire cystoïde. Situé en périphérie, il reste muet plus longtemps. D'autres localisations ont été décrites, intra-camérulaires, iriennes, cristalliniennes, mais elles sont exceptionnelles.

La localisation conjonctivale est la plus fréquente des atteintes annexielles. Son évolution se fait vers l'accroissement progressif avec possibilité de fissuration. Au niveau de l'orbite, la localisation rétro-oculaire peut être responsable d'une exophtalmie ; la localisation intramusculaire entraîne un trouble oculomoteur responsable de diplopie. La localisation palpébrale est rarissime et peut revêtir l'aspect d'un chalazion.

Figure 5 : Cysticercose oculaire – Localisation vitrénne



La flèche montre le scolex évaginé.

2. 3. 5. – Cysticercose généralisée

C'est l'association des atteintes cérébrale, oculaire, sous-cutanée, ou musculaire. Elle peut se manifester de façon bruyante associant crises épileptiques, baisse de l'acuité visuelle, céphalées, désorientation temporo-spatiale, myalgies et nodules sous-cutanés (Avodé *et al.*, 1994), ou, au contraire, silencieuse, révélée par des calcifications fusiformes lors d'un examen radiologique. Cependant, on retrouve souvent dans les antécédents un épisode neurologique en rapport avec une localisation cérébrale.

2. 4. – Diagnostic

Les techniques de détection des porteurs de ténia adulte consistent à la recherche d'œufs de ténia ou de proglottis par examen parasitologique des selles ou la technique ELISA pour la détection d'antigènes circulants (Allan *et al.*, 1996). Cette dernière est la technique la plus sensible. Par ailleurs, un résultat positif ne doit pas être considéré comme une preuve sans équivoque de l'infection. Le diagnostic de confirmation est apporté par la mise en évidence d'œufs ou de proglottis de ténia dans les selles. Une des limites de l'examen parasitologique des selles réside dans l'incapacité de détecter tous les cas de tœnirose car l'émission d'œufs ou de proglottis dans les fèces est très irrégulière. Parmi ces techniques, seule l'identification de proglottis permet un diagnostic différentiel des deux espèces parasitant l'homme. Des progrès ont été récemment rapportés dans la recherche d'œufs dans les fèces en utilisant la technique d'amplification par PCR (Nunes *et al.*, 2003). Une telle technique pourra permettre de différencier les deux espèces sans avoir besoin de disposer de proglottis.

Le diagnostic de la cysticercose, en particulier de la neurocysticercose, est souvent difficile en raison du caractère polymorphe des manifestations cliniques. Si un examen physique et une analyse de l'histoire clinique et des conditions de vie du patient peuvent s'avérer utile dans certains cas, le diagnostic repose essentiellement sur les résultats de la

neuro-imagerie (tomodensitométrie, Imagerie de Résonance Magnétique : IRM) et des examens biologiques.

2. 4. 1. – Techniques radiologiques

◆ La tomodensitométrie (TDM) est la meilleure méthode pour détecter les calcifications intracérébrales associées à une infection ancienne.

◆ L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) est plus sensible que la TDM aux stades pathologiques du développement de la lésion. Elle peut montrer la progression des kystes. Dumas *et al.* (1997) ont utilisé l'IRM pour classer les changements observés dans les cysticerques parenchymateux afin de décrire les caractéristiques de la dégénération des cysticerques après traitement par des médicaments anti-cysticerquiens. Elle permet aussi de mettre en évidence les scolex au sein des lésions kystiques.

Les deux méthodes sont appropriées pour les cysticerques intraparenchymateux. Mais l'IRM est plus indiquée pour les localisations intraventriculaires, sous-arachnoïdiennes, cisternales et spinales.

◆ Les radiographies des parties molles à la recherche de calcifications ne sont pratiquement plus utilisées.

2. 4. 2. – Diagnostic biologique

2. 4. 2. 1. – Examen anatomo-pathologique

C'est le seul examen permettant un diagnostic de certitude par l'identification du cysticerque (vivant ou mort) à partir d'une biopsie ou d'un prélèvement post mortem. Dans le cas d'une localisation oculaire, le parasite peut être vu directement (White, 2000).

2. 4. 2. 2. – Techniques immunologiques

Les techniques immunologiques utilisées actuellement consistent à rechercher des anticorps dirigés contre *T. solium* ou des antigènes circulants de *T. solium* dans le sérum ou le liquide céphalo-rachidien (LCR) (Garcia *et al.*, 1998). Les techniques décrites sont le test de fixation du complément, l'hémagglutination indirecte (HAI), l'agglutination au latex, l'Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA), l'Enzyme-linked Immunoelctrotransfert Blot assay (EITB) (Larralde *et al.*, 1986 ; Tsang *et al.*, 1989). L'EITB consiste à détecter les bandes de glycoprotéines spécifiques au *T. solium*. Sept bandes ont été identifiées pour le diagnostic de la cysticercose. Il s'agit de glycoprotéines de poids moléculaires 13 kilodaltons (kDa), 14 kDa, 18 kDa, 21 kDa, 24 kDa, 39-42 kDa, et 50 kDa (Tsang *et al.*, 1989 ; Diaz *et al.*, 1992 ; Rodriguez-Canul *et al.*, 1997). Les rapports initiaux font état d'une sensibilité de 98% et d'une spécificité proche de 100% (Tsang *et al.*, 1989). Mais des études ultérieures ont rapporté que si l'EITB reste très sensible chez les patients présentant des lésions multiples, elle est beaucoup moins sensible chez les patients avec des lésions uniques ou des lésions calcifiées (Wilson *et al.*, 1991). La technique ELISA a l'inconvénient d'avoir un taux élevé de faux positifs et de faux négatifs. Ceci est dû à l'utilisation d'antigènes présents dans l'extrait soluble ou le liquide vésiculaire des cysticerques. La technique ELISA, bien que de sensibilité et de spécificité plus faibles que celles de l'EITB, est la technique la plus utilisée car elle est simple, pratique pour le terrain, et de faible coût (Diwan *et al.*, 1982). Alors, des études sur l'amélioration de la solution d'antigènes ont été entreprises pour remédier à cet handicap. L'utilisation d'antigènes recombinants a été rapportée comme une bonne alternative (Hubert *et al.*, 1999 ; Sato *et al.*, 2003). D'autres équipes ont travaillé sur la détection d'antigènes circulants par des anticorps monoclonaux ou polyclonaux (Correa *et al.*, 1989). Brandt *et al.* (1992) ont trouvé que des anticorps monoclonaux dirigés contre des produits d'excrétion – sécrétion de *T. saginata* montraient une forte réactivité avec les antigènes circulants de *T.*

solium. L'ELISA pour la détection d'antigènes circulants a été évaluée par plusieurs auteurs (Garcia *et al.*, 1998 ; Nguekam *et al.*, 2003a, b et c). Ces différents auteurs ont rapporté que cette technique a une très grande sensibilité et est très spécifique. La technique utilisée par Garcia *et al.* (1998) ne détecte pas le cysticerque viable unique ainsi que les lésions en cours de dégénération ; celle utilisée par Nguekam *et al.* (2003a, b et c) a détecté tous les individus hébergeant des cysticerques vivants. Elle a une excellente corrélation avec la tomodynamométrie et peut procurer des informations importantes sur la viabilité des parasites. Le taux d'antigènes circulants étant proportionnel au nombre de parasites vivants, elle permet de suivre l'évolution des patients ayant reçu un traitement antiparasitaire et d'évaluer l'efficacité d'un tel traitement. Elle peut contribuer à la compréhension de la pathogénèse de la neurocysticercose humaine, en particulier le processus de dégénération du parasite. Elle peut aider à la conduite à tenir. Comme elle ne détecte que les porteurs de cysticerques vivants, elle donne une meilleure idée de la prévalence de la cysticercose active que les tests de détection d'anticorps. Ceci peut être néanmoins un inconvénient car elle sous estime la prévalence de la cysticercose puisque les cysticerques calcifiés ne sont pas détectés. Ito *et al.* (1998) ont rapporté que l'utilisation de la fraction pH 9,2-9,6 de la solution d'antigène préparée à partir de liquide vésiculaire ou de vésicule entier du stade larvaire de *T. solium* et séparée par isoélectrofocalisation est une méthode simple, très sensible et très spécifique pour une application dans les pays où la maladie sévit.

2. 4. 2. 3. – Technique d'amplification de l'ADN

La technique d'amplification de l'ADN par PCR (Polymérase Chain Reaction) est un outil très utile et très spécifique pour différencier des espèces très proches. Elle a été utilisée avec succès pour différencier l'infection à *T. saginata* de l'infection à *T. solium* (González *et al.*, 2000 ; Rodriguez-Hidalgo *et al.*, 2002). La différenciation des deux espèces *T. saginata* et *T. solium* est importante du point de vue médical étant donné que les deux parasites ne présentent pas la même pathogénicité et que le diagnostic différentiel peut être difficile dans certains cas. En outre, la PCR permet aussi de confirmer des cas de cysticercose à *T. solium* (Theis *et al.*, 1996).

2. 5. – Traitement

La téniose intestinale est traitée médicalement par l'administration de niclosamide à la dose de 4 comprimés répartie en deux prises à 1 heure d'intervalle, ou de praziquantel en dose unique de 10 mg/kg. Chez la femme enceinte, on préfère utiliser le sulfate de paromomycine à la posologie de 16 sachets de 250 mg en une seule fois. Pawlowski (1991) a rapporté que des doses faibles de praziquantel restent efficaces.

Pour la neurocysticercose, l'intervention chirurgicale a été, il n'y a pas si longtemps, le seul traitement disponible. Le praziquantel est administré oralement à la dose de 50 mg/kg/j divisé en deux prises pendant 15 jours. Il est absorbé rapidement par l'organisme et est éliminé dans les urines. Il n'a pas d'effets toxiques connus. Les effets secondaires sont généralement légers et disparaissent dans les 24 heures. Les symptômes les plus fréquemment rapportés sont une douleur épigastrique, une gêne abdominale diffuse, une nausée, l'anorexie, une constipation ou une diarrhée, des vertiges, des maux de tête, des éruptions cutanées (prurigo ou urticaire), et de la fièvre. L'albendazole est un anti-helminthe à large spectre. Il est utilisé en dose unique ou en cures de 15 mg/kg/j pendant 8 jours. Il est rapidement, bien que partiellement, absorbé par l'organisme, et est éliminé par les urines. Il est très bien toléré et les effets secondaires n'apparaissent que chez 6 % des cas. L'administration de praziquantel ou d'albendazole nécessite une surveillance neurologique ; il est recommandé d'y associer une corticothérapie pour limiter les réactions inflammatoires provoquées par la lyse parasitaire. Il n'est pas recommandé de les utiliser chez la femme enceinte car des tests sur les animaux ont montré des effets embryotoxique et tératogénique.

S'il est communément admis que les médicaments antiparasitaires n'ont aucun effet sur les lésions calcifiées, les cliniciens ne sont pas d'accord sur la nécessité de traiter médicalement les autres cas de neurocysticercose. Certains auteurs ont observé que l'utilisation de praziquantel et d'albendazole a nettement amélioré le pronostic de la neurocysticercose essentiellement dans les localisations parenchymateuses (Leger *et al.*, 1985 ; Sotelo *et al.*, 1985 ; Zardi *et al.*, 2000), d'autres ont rapporté que le traitement

médicamenteux de la neurocysticercose apporte plus d'inconvénients que d'avantages (Takayanagui et Jardim, 1992). Salinas et al. (1999) ont conclu, après meta-analyse de toutes les publications portant sur le traitement de la cysticercose, qu'il n'y a pas suffisamment de preuve démontrant que la thérapie par des médicaments antiparasitaires apporte un quelconque bénéfice clinique au patient. Garcia *et al.* (2002a) présentent les conduites à tenir recommandées : (a) le traitement de la neurocysticercose doit prendre en compte aussi bien le nombre et la localisation des lésions que la viabilité des parasites ; (b) un accroissement des cysticerques parenchymateux n'est pas un fait commun et peut être mortel ; un parasite qui augmente en taille mérite une conduite active soit par des médicaments antiparasitaires, soit par intervention chirurgicale ; (c) chez les patients présentant une hypertension intracrânienne secondaire à une neurocysticercose, le traitement par des médicaments antiparasitaires n'est jamais la priorité dans la réduction de la pression élevée. La priorité est de résoudre le problème d'hypertension avant d'envisager toute autre forme de thérapie ; (d) les médicaments anti-épileptiques constituent la thérapie principale des crises d'épilepsie dans la neurocysticercose. En général, les crises d'épilepsie doivent être gérées de la même manière que les autres causes de crises d'épilepsie secondaires (crises d'épilepsie antérieures) puisqu'elles sont dues à un foyer organique déjà présent depuis longtemps. Toutefois, après la résolution de l'infection parasitaire, les patients ne présentant plus de crises d'épilepsie peuvent cesser de prendre les médicaments anti-épileptiques. Les médicaments antiparasitaires ne doivent pas être considérés comme une alternative à une thérapie médicamenteuse anti-épileptique. Pour les patients présentant des formes mixtes de neurocysticercose, une considération des risques et des bénéfices doit être faite pour choisir l'ordre des interventions.

Dans le cas de la cysticercose porcine, l'oxfendazole à 30 mg/kg en prise unique (Gonzales *et al.*, 1996) ou l'albendazole à 30 mg/kg/j pendant 3 jours se sont révélés très efficaces (Gonzales *et al.*, 1995). Toutefois, l'utilisation à grande échelle de l'albendazole est limitée par les effets secondaires et la contrainte de dose multiple.

2. 6. – Prévention – Vaccination

La tæniose / cysticercose chez l'homme et le porc est reconnue comme étant une maladie "potentiellement éradicable" pour diverses raisons : a)- l'homme est nécessaire au maintien du cycle biologique, b)- l'infection par le ver adulte chez l'homme est la seule source d'infection des hôtes intermédiaires, c)- l'hôte intermédiaire est un animal domestique et peut être donc contrôlé, d)- il n'existe pas de réservoirs sauvages significatifs, e)- une intervention pratique est disponible sous forme de chimiothérapie de masse des porteurs de ténia par des médicaments sans danger et efficaces (Schantz *et al.*, 1993). Les moyens de diagnostic des porteurs de ténia adulte ont été améliorés et simplifiés par la technique ELISA pour la détection de copro-antigènes (Allan *et al.*, 1996). Les mesures de contrôle à court terme consistant à identifier les foyers et à traiter médicalement tous les cas diagnostiqués ou suspects de tæniose ne sont vraiment efficaces que si elles sont supportées par les campagnes d'éducation sanitaire et les améliorations de l'hygiène individuelle et des installations sanitaires à l'intérieur de la zone d'endémicité (Pawlowski, 1990). En effet, lors des programmes de traitement, il faut prendre la précaution de ne pas augmenter le risque de contamination locale de l'environnement ce qui conduirait à des résultats contraires aux intentions initiales (Sciutto *et al.*, 2000). L'amélioration des systèmes sanitaires et l'éducation de la population nécessitent aussi bien un progrès économique qu'une volonté politique dans la détermination des priorités communautaires (Lightowers, 1999). Malheureusement, le développement social est un processus lent, et s'il n'inclut pas toutes les classes sociales, l'infection à *T. solium* subsistera. Par ailleurs, il est nécessaire de mettre en place une surveillance médicale car les formes non symptomatiques de la cysticercose peuvent être exacerbées par le traitement médical (Sciutto *et al.*, 2000). En outre, il faut tenir compte de la possibilité de développement de résistance aux médicaments, aussi bien que des effets secondaires potentiels chez les personnes traitées, en particulier, les enfants (Sciutto *et al.*, 2000).

Des efforts de contrôle focalisés sur l'éradication de la cysticercose porcine à travers l'amélioration des conditions d'élevage du porc et l'inspection de la viande de porc aux abattoirs ont été entrepris. Si cette approche a entraîné l'éradication de l'infection à *T. solium* aux Etats Unis et en Europe, aucune amélioration n'a été pratiquement observée dans les pays

du Tiers Monde pour différentes raisons dont la plus importante est économique. Dans ces pays, l'élevage de porcs dans un endroit clos, les empêchant ainsi d'avoir accès au fèces humaines, constitue une dépense supplémentaire pour élever les animaux. Par ailleurs, afin de ne pas subir une perte économique, les éleveurs ont appris à diagnostiquer la cysticercose porcine et préfèrent vendre leurs animaux contaminés dans les filières clandestines plutôt que de les envoyer aux abattoirs où la viande est inspectée, et de risquer ainsi une saisie (White *et al.*, 1997).

Un autre stratégie pour contrôler la cysticercose consiste à traiter médicalement tous les porcs infectés. Mais elle a pour inconvénient de générer une augmentation du commerce de la viande ladre qui serait alors difficile à détecter, et de rendrait inefficace l'inspection vétérinaire (Lightowlers, 1999).

Les vaccins offrent un outil potentiel pour aider à contrôler la transmission du parasite (Sciutto *et al.*, 2000). La vaccination des porcs est une stratégie d'intervention faisable étant donné que la durée de vie du porc avant l'abattage. Par ailleurs, l'acquisition de la protection est relativement courte chez la plupart des porcs. On peut supposer que la vaccination serait mieux acceptée par les éleveurs de porcs puisque les animaux ne seront pas saisis. La vaccination est aussi une méthode qui peut avoir des avantages économiques, car même si les porcs continueraient à être nourris de façon rustique avec des ordures ménagères, ils pourraient résister à l'infection. Leurs propriétaires pourraient alors les vendre à un prix plus élevé puisque la viande serait indemne de cysticerques (Sciutto *et al.*, 2000). L'efficacité potentielle de la vaccination des porcs a été démontrée par des tests expérimentaux (Molinari *et al.*, 1983) et des tests menés sur le terrain (Molinari *et al.*, 1993, 1997) en utilisant différents extraits du parasite. L'antigène d'oncosphère a montré le niveau de protection le plus élevé (Pathak *et al.*, 1990). Toutefois, leur application est limitée par l'approvisionnement et le contrôle de qualité des antigènes dérivés directement du parasite (Lightowlers *et al.*, 2000). L'utilisation d'antigènes recombinants définis offrent le plus grand potentiel pour surmonter ces limitations d'approvisionnement en antigène. Les représentants de la famille des Taeniidae ont plusieurs traits communs dans leur relations immunologiques hôte-parasite (Lightowlers *et al.*, 1999), la préparation d'antigène à partir d'autres espèces de ténia plus facile à obtenir que *T. solium* a été évaluée. Plancarte *et al.* (1999) ont trouvé une protection de 93 % contre le développement de cysticerques vivants et une protection de 74 %

sur le nombre total de cysticerques en utilisant des antigènes recombinants préparés à partir de *T. ovis*. Le test sur le terrain de trois peptides synthétiques basés sur des séquences peptidiques de *T. crassiceps* est très prometteur (Huerta *et al.*, 2002). Une diminution de 98,7 % du nombre total de cysticerques et une prévalence de cysticercose diminuée de 52,6 % ont été rapportées. Les essais de production en grande quantité de ces peptides sont encourageants ; leurs immunogénicités sont accrues par l'expression dans le phage filamenteux M13, dans les plantes transgéniques (carottes, papaye), et par association à des protéines immunogènes bactériennes transporteurs (Sciutto *et al.*, 2002).

Pour être efficace, les stratégies d'éradication de la tæniose / cysticercose nécessitent des programmes qui combinent à la fois le contrôle des risques, le traitement des porteurs de ver adulte, et la vaccination des porcs (Sciutto *et al.*, 2000).

III – Travaux personnels : Diagnostic biologique et enquêtes épidémiologiques

3. 1. – Introduction

Dans la plupart des pays africains, il y a très peu de neurologues et la majorité des médecins généralistes ne connaissent pas la cysticerose. L'accès aux techniques modernes de neuro-imagerie et aux diagnostics sérologiques est limité. Les formes cliniques de la neurocysticerose sont extrêmement variables rendant le diagnostic difficile. La cysticerose a été rapportée dans plusieurs pays en Afrique. En Afrique sub-saharienne, très peu d'études épidémiologiques ont été réalisées sur la population générale. Au Bénin, notre équipe a pu effectuer une étude épidémiologique au niveau national. Elle nous a permis de rendre compte de la prévalence globale de la cysticerose dans ce pays. Une autre étude a été ensuite réalisée afin d'identifier des petites zones où la prévalence pour la cysticerose est très élevée. L'identification de ces zones permettra de prendre des mesures qui vont aider à la planification de la politique de santé à appliquer dans ces régions.

En Afrique, la majorité des études rapportées dans la littérature sont des études effectuées sur des malades neurologiques. De ces études, on a observé que les crises d'épilepsie étaient citées comme étant la manifestation clinique la plus fréquente de la neurocysticerose. De même, plusieurs études réalisées en Amérique Centrale et du Sud montraient que la neurocysticerose est la cause la plus commune d'épilepsie chez les adultes.

Les études réalisées en Afrique avaient suscité des points de vue contradictoires en ce qui concerne la relation entre neurocysticerose et épilepsie. Dans notre étude au Burundi, nous avons essayé de voir s'il existe une relation entre la neurocysticerose et l'épilepsie.

Les prévalences rapportées dans les différents pays d'Afrique montrent une grande variabilité entre les différentes régions d'Afrique. Cette variabilité est peut-être due au manque de méthodes épidémiologiques appropriées ou à l'absence de technique de diagnostic

standardisée. Dans une étude réalisée à Madagascar, nous avons comparé les résultats obtenus par trois laboratoires différents sur des échantillons de sérum et de LCR prélevés sur des patients épileptiques et non-épileptiques.

3. 2. – Enquêtes réalisées

3. 2. 1. – Au Bénin (publications 2 et 3)

Au Bénin, une étude séroépidémiologique est réalisée au niveau national. Un échantillonnage en trois niveaux (sous-préfectures, communes et habitations) est effectué dans les 6 départements du Bénin (Atacora, Atlantique, Borgou, Mono, Ouémé et Zou). Au premier niveau, 1 sous-préfecture sur 4 est sélectionnée de façon aléatoire dans chaque département. Au second niveau, 1 commune sur 4 est choisie au hasard dans chaque sous-préfecture considérée. Au troisième niveau, dans chaque commune choisie une première habitation est sélectionnée à partir d'une liste de recensement. Puis une habitation sur 4 est choisie à partir de la première.

Après avoir obtenu le consentement des sujets, un prélèvement sanguin est réalisé. Le sérum est recueilli après centrifugation puis conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. Deux mille six cents vingt-cinq sérums sont recueillis sur 1329 femmes et 1296 hommes. Les anticorps dirigés contre les cysticerques de *T. solium* sont d'abord recherchés par la méthode ELISA en utilisant un extrait brut soluble de *C. cellulosae* comme antigène. Puis, les 41 échantillons positifs (1,6%) sont ensuite analysés par la méthode EITB. Trente-cinq échantillons donnent des résultats positifs soit une séroprévalence de 1,3% (Intervalle de confiance à 95% [IC à 95%] : 0,9 – 1,9). La séroprévalence est de 1,9% (IC à 95% : 1,2 – 2,7) chez les hommes et 0,8% (IC à 95% : 0,4 – 1,5) chez les femmes. La différence observée entre les hommes et les femmes est significative ($P < 0,05$). On observe aussi un accroissement progressif de la séroprévalence avec l'âge. Les prévalences les plus élevées ont été observées en Atacora et

Atlantique, deux départements non musulmans (3,3% et 3,0% respectivement). Ceci démontre que la cysticercose est un important problème de Santé Publique au Bénin.

Une autre étude a été ensuite réalisée dans le département de l'Atacora afin d'identifier des petites zones de prévalence élevée pour la cysticercose, soit supérieure à 4%. D'après l'étude précédente, la prévalence pour la cysticercose était de 1,6% au Bénin. On peut donc estimer que le double de cette prévalence soit 4% constitue un seuil à partir duquel la cysticercose peut être considérée comme un problème de Santé Publique. L'identification de telles zones permet d'aider à la planification de la politique de Santé. Pour effectuer cette étude, nous avons choisi la méthode LQAS (Lot Quality Assurance Sampling). Cette méthode est très utilisée dans l'industrie pour identifier de petites zones de faible performance.

Le département de l'Atacora comporte 14 sous-préfectures. Seize communes situées dans 4 sous-préfectures ont été choisies pour l'étude. Chaque commune constitue un lot. Soixante-cinq sujets sont choisis de façon aléatoire dans chacune des 16 communes sélectionnées. Le lot est classé comme rejeté s'il contient au moins un sujet qui a un résultat positif pour la recherche d'anticorps dirigé contre les cysticerques de *T. solium*. Cette recherche d'anticorps est réalisée d'abord par la méthode ELISA. Puis, tous les échantillons donnant des résultats positifs par ELISA sont ensuite testés par la méthode EITB.

Sur les 1 040 sujets inclus dans cette étude, 434 (41,8%) sont des hommes et 606 (58,2%) des femmes. Quarante-un sujets dont 14 hommes (3,2%) et 27 femmes (4,5%) ont un résultat positif pour la recherche d'anticorps anti-*C. cellulosae*, soit une séroprévalence globale de 3,9% (IC à 95% : 2,9 – 5,4).

Sur les 16 communes sélectionnées, nous en avons identifié 13 qui présentent une séroprévalence supérieure à 4% (elles ont au moins un sujet dont la sérologie pour la cysticercose est positive).

3. 2. 2. – Au Burundi (publication 4)

Au Burundi, plusieurs foyers de cysticerose ont été identifiés (provinces de Kayanza, de Bururi, de Cibitoke, et de Ngozi) mais peu d'études ont été réalisées sur la relation possible entre cysticerose et épilepsie.

L'objectif de notre étude est d'évaluer le rôle de la cysticerose dans la survenue de l'épilepsie au Burundi.

C'est une étude de cas – témoins appariés réalisée dans la commune de Kiremba au Burundi pendant les mois de mars et d'avril 2001. Un cas épileptique est apparié à deux témoins selon l'âge. Les cas sont des sujets ayant présenté au moins deux crises d'épilepsie non provoquées survenant sur une durée de plus de 24 heures et résidant dans la commune de Kiremba. Les témoins sont des sujets résidant aussi à Kiremba qui n'ont jamais présenté de maladie neurologique et n'ont pas de lien de parenté avec les cas afin de prévenir toute propension génétique à l'épilepsie parmi les témoins. La séropositivité pour la cysticerose par la méthode ELISA est l'exposition mesurée.

Trois cents vingt quatre cas avec un début d'épilepsie entre 1950 et 2000, et 648 témoins appariés avec l'âge sont inclus dans l'étude.

La sérologie pour la recherche d'anticorps dirigé contre la larve de *T. solium* s'est révélée positive pour 59,6% des personnes présentant des crises d'épilepsie et 31,5% des témoins ($p < 0,001$). La séropositivité pour la cysticerose a une relation avec la survenue de l'épilepsie (odds ratio = 3,8 ; IC à 95% : 2,5 – 5,1). Dans une analyse multivariée qui prend en compte les autres facteurs potentiellement responsables de la survenue de l'épilepsie, l'association entre cysticerose et épilepsie reste significative (odds ratio = 4,1 ; IC à 95% : 3,0 – 5,6).

Notre étude a aussi permis de mettre en évidence l'importance de la cysticerose dans la survenue de l'épilepsie dans la commune de Kiremba puisque 31,5% des témoins montraient un résultat positif pour la recherche d'anticorps dirigé contre la larve de *T. solium*

dans le sérum. Le risque attribuable à la cysticerose dans cette population est 50% (IC à 95% : 42 - 57).

3. 2. 3. – Au Kenya (publication 5)

La cysticerose humaine n'a pas encore été décrite au Kenya. Lors de notre étude réalisée durant le second semestre 1998, des indications font suspecter que le parasite existe au Kenya. Notre étude consiste à une étude cas-témoins appariés. Les cas sont des patients ayant présenté des crises d'épilepsie. Un patient est considéré comme épileptique s'il répond aux critères de la Commission d'Epidémiologie et de Pronostic de la Ligue Internationale Contre l'Epilepsie dans « Directives pour les études épidémiologiques sur l'épilepsie » (Commission on Epidemiology and Prognosis, International League Against Epilepsy, 1993). Les témoins sont des personnes ne présentant pas d'épilepsie et vivant dans la même région que les cas depuis leur naissance. Les témoins sont appariés aux cas selon l'âge et le sexe.

Tout patient traité pour épilepsie dans une organisation de soins non gouvernementale pour l'épilepsie d'une région rurale (Nyahururu) et d'une région urbaine (Nairobi) du Kenya est examiné et interrogé en utilisant le Questionnaire pour l'Investigation de l'Epilepsie dans les Pays Tropicaux (Institut d'épidémiologie neurologique et de neurologie tropicale, Association panafricaine des sciences neurologiques, 2000). Les témoins sont interrogés en utilisant un questionnaire séparé conçu pour ce but. Toutes les personnes incluses ont donné leur consentement à participer à l'étude. Le protocole a été examiné et approuvé par le Comité d'Ethique Nationale de Kenyatta et de l'Université de Nairobi. Quarante-deux cas et 124 témoins sont recrutés pour l'étude. La sérologie pour la cysticerose est réalisée par une méthode ELISA utilisant un extrait brut soluble d'antigène de *C. cellulosae*.

Les cas et les témoins sont identiques pour les caractéristiques démographiques. Cinq cas sur 99 (5,1%) et 3 témoins sur 124 (2,4%) ont eu une sérologie positive pour la cysticerose. Il est admis qu'il existe une corrélation positive entre l'épilepsie et la neurocysticerose. La prévalence plus élevée observée chez les patients présentant des crises

d'épilepsie par rapport aux témoins suggère que la cysticerose peut être un des facteurs responsables de la survenue des crises d'épilepsie. Il serait alors raisonnable de faire de façon systématique une recherche d'anticorps anti- *T. solium* ou d'antigènes de celui-ci et au moins une recherche de nodules sous cutanés pour tout patient souffrant de crises d'épilepsie.

3. 2. 4. – A Madagascar (publication 6)

Des échantillons de sérums et de liquide céphalo-rachidien (LCR) ont été prélevés sur 80 patients présentant des crises d'épilepsie et 82 patients n'ayant jamais eu d'épilepsie. Les échantillons ont été analysés par trois laboratoires différents. Au total, six méthodes ont été utilisées : une méthode EITB, une méthode HAI, et quatre méthodes ELISA (ELISA-1, ELISA-2, ELISA-3, ELISA-4). ELISA-3 utilise comme antigène une solution préparée à partir de cysticerques provenant du Togo. Les trois autres méthodes ELISA, de même que l'EITB et l'HAI, utilisent une solution préparée à partir de cysticerques provenant de Madagascar. Les trois méthodes ELISA utilisant des cysticerques provenant de Madagascar diffèrent par la préparation de la solution d'antigène. ELISA-2 utilise le liquide vésiculaire alors que les deux autres les vésicules entières.

Quelle que soit la technique utilisée, les résultats obtenus chez les patients épileptiques ne montrent pas de différence significative avec ceux des patients non épileptiques que ce soit dans le sérum ou dans le LCR.

En comparant les différentes méthodes entre elles, les résultats obtenus dans le sérum ne concordent pas entre elles ni avec la méthode EITB. En revanche, les résultats obtenus dans le LCR montrent une excellente concordance entre les différentes méthodes sauf avec l'ELISA utilisant des cysticerques provenant du Togo (ELISA-3).

En recalculant la sensibilité et la spécificité de l'HAI et des différentes ELISA par rapport à l'EITB, que nous avons considéré comme étant la référence, nous avons trouvé que les différentes méthodes ont une spécificité élevée mais une faible sensibilité à l'exception de

ELISA-1. Cette dernière, au contraire, montrent une grande sensibilité avec une spécificité modérée.

Il est vraisemblable que les différences observées soient liées au protocole de l'ELISA. Toutefois, il est aussi possible que des facteurs génétiques (entraînant des différences des différences antigéniques) liés à l'origine géographique des cysticerques ainsi que des facteurs génétiques liés aux différents hôtes (entraînant des réponses immunologiques différentes) jouent un rôle.

CHAPITRE II – *Taenia solium* / *Cysticercus cellulosae* : Etude de la biodiversité

I – Introduction

Plusieurs faits font penser à l'existence de variabilité génétique au sein de *T. solium*. Tout d'abord les études épidémiologiques effectuées dans les pays de l'Amérique Centrale et du Sud rapportent une prédominance de la localisation cérébrale ; alors qu'en Afrique et en Asie, toutes les localisations ont été observées. Il est possible que cette différence ne soit que le résultat des différences dans les moyens de diagnostic utilisés dans ces pays. Singh (1997) a évoqué la possibilité que la différence d'incidence d'hypertension crânienne et des formes racémeuses liées à une cysticercose observée entre l'Inde et l'Amérique Latine soit due à une sous-estimation des méningites d'origine cysticerquienne du fait que la coloration de Wright, une technique qui permet de les différencier des méningites tuberculeuses, n'est pas toujours réalisée en Inde. En outre, l'utilisation des techniques d'imagerie médicale (tomodensitométrie et IRM) pour le diagnostic de la neurocysticercose est très courante en Amérique Latine ; alors qu'en Afrique, ces techniques sont rarement disponibles, et que seulement l'analyse des liquides biologiques, la recherche de nodules sous cutanés, et la pratique du fond d'œil sont les techniques de diagnostic les plus utilisées.

Une étude récente a rapporté que les facteurs propres à l'hôte comme l'âge, le sexe, le statut génétique, et l'exposition participent à la diversité de la manifestation de la maladie en modulant la susceptibilité à l'infection et en induisant une réaction inflammatoire (Fleury, 2002).

D'autres facteurs liés au parasite lui-même participent aussi à cette diversité en influant sur la réponse immunitaire de l'hôte dont l'âge du parasite. Il est reconnu qu'au cours

du temps, le parasite évolue spontanément vers la mort suggérant qu'il perd progressivement son aptitude à détourner les mécanismes de défense de son hôte. Comme chez l'hôte, le statut génétique du parasite est un des paramètres intervenant dans cette diversité.

En 1982, Correa *et al.* ont rapporté que les cysticerques prélevés sur différents patients n'ont pas la même composition dans leur antigène de surface. Yakoleff *et al.* (1982) ont déjà rapporté que la diversification antigénique du parasite pourrait être la cause des différences dans la réponse immunitaire observées chez l'homme.

Par ailleurs, les cysticerques de *T. solium* prélevés sur différents porcs naturellement infectés montrent des différences morphologiques et physiologiques. Lorsqu'on met les cysticerques en présence de sérum d'origine porcine, les réactions observées varient allant d'un léger changement du taux de consommation de l'oxygène à une altération généralisée du tégument de la paroi vésiculaire associée à une réduction de la capacité à évaginer et à une diminution du taux de consommation d'oxygène (Correa *et al.*, 1987).

II – Généralités sur l'étude de la biodiversité

2. 1. – Méthodes

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité des organismes (plantes ou animales). Parmi ces méthodes, on peut citer les isoenzymes, l'analyse RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), le séquençage de l'ADN, l'analyse PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction–RFLP), l'analyse SSCP (Single-Strand Conformation Polymorphism), la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), l'ALFP (Amplified Fragment Length Polymorphism), ou encore l'utilisation des minisatellites et des microsatellites. La plupart de ces techniques nécessitent la connaissance préalable de la séquence d'ADN à étudier. Pour notre étude, nous nous proposons d'étudier les isoenzymes

par la technique d'isoélectrofocalisation d'une part et l'ADN par la technique dite "Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)" d'autre part.

2. 2. – Isoélectrofocalisation

L'isoélectrofocalisation (IEF) est une technique qui permet de séparer les protéines en se basant sur la différence des charges électriques qu'elles portent.

Les isoenzymes sont les différentes formes moléculaires d'un système enzymatique avec la même fonction catalytique. Cette différence est due à une mutation, une délétion ou une insertion d'un ou plusieurs acides aminés. Ce changement dans la structure polypeptidique de l'enzyme peut entraîner une modification de la structure tridimensionnelle ou un changement de la charge électrique globale portée par la molécule. Les isoenzymes qui n'ont pas la même charge globale peuvent être différenciées par la technique d'isoélectrofocalisation car elles n'ont pas la même mobilité lorsqu'elles sont soumises à une électrophorèse. Sous l'action d'un champ électrique, les isoenzymes vont migrer vers l'anode ou vers la cathode selon la charge globale qu'elle porte, et s'arrêteront lorsque cette charge est nulle (c'est le point isoélectrique). En utilisant ensuite des techniques de coloration spécifiques à l'enzyme que l'on veut étudier, on peut visualiser la position de l'enzyme sur le gel.

La technique d'isoélectrofocalisation s'est révélée être une technique très utile pour la détection de différences inter et intra spécifiques des organismes. Elle a été très utilisée pour caractériser différentes souches de protozoaires : *Toxoplasma gondii* (Dardé *et al.*, 1992), *Leishmania* (Piarroux *et al.*, 1994 ; Canto-Lara *et al.*, 1998 ; Oskam *et al.*, 1998 ; Shamsuzzaman *et al.*, 2000), *Trypanosoma cruzi* (Zillmann & Ebert, 1983), *Cryptosporidium* (Ogunkolade *et al.*, 1993).

Les isoenzymes ont été aussi utilisées pour étudier les variations génétiques chez différentes espèces de mollusques du genre *Lymnaea* (Coutellec-Vreto *et al.*, 1994).

Chez les helminthes, elles ont permis de révéler des variations génétiques que ce soit chez les trématodes (Agatsuma *et al.*, 1992 ; Paniagua *et al.*, 1999) ou les nématodes (Mydyski & Dick, 1985 ; Ibrahim *et al.*, 1994 ; Šnábel *et al.*, 1998).

Chez les *Tænia*, elles ont été utilisées pour différencier les espèces entre elles (Le Riche & Sewell, 1978 ; Allsopp *et al.*, 1987). Okamoto *et al.* (1995) ont utilisé les isoenzymes pour étudier les variations intra spécifiques de *Tænia tæniaeformis* afin d'établir la relation génétique entre les souches sauvages et les souches entretenues au laboratoire.

2. 3. – RAPD

La RAPD est une technique dérivée de la technique PCR (Polymerase Chain Reaction). La PCR est une technique qui consiste à amplifier un segment de l'ADN en utilisant deux amorces. Les amorces sont des séquences de 20 à 50 oligonucléotides qui vont se fixer sur les deux brins d'ADN, à chaque extrémité de la région à amplifier. Leurs séquences sont choisies de telle sorte qu'elles soient complémentaires à la séquence d'ADN cible. L'ADN double brin est dissocié par effet de température (c'est la dénaturation). Lorsque la température atteint une certaine valeur qui dépend de la composition et de la longueur des amorces, ces dernières vont se fixer sur l'ADN (c'est l'hybridation) et vont initier la copie du segment d'ADN à amplifier. La reconstitution du brin complémentaire de l'ADN est effectuée par une enzyme appelée ADN polymérase (c'est l'élongation). Les deux brins d'ADN vont donner deux ADN double brin identiques à l'ADN initial. En recommençant le cycle, chaque ADN double brin va redonner deux autres ADN double brin. Au bout de n cycles, on obtiendra 2^n ADN à partir d'un seul segment de celui-ci.

Dans le cas de la RAPD, on n'a besoin que d'une seule amorce. Cette amorce est constituée de quelques nucléotides et sera choisie au hasard. Elle s'hybride de façon aléatoire sur les deux brins de l'ADN et initie l'amplification de la région d'ADN comprise entre deux amorces. Bien que les amorces utilisées soient choisies au hasard, leur composition doit respecter certaines règles pour que l'amplification puisse se produire : (a) l'amorce doit

contenir au moins 9 nucléotides, (b) la composition en C+G est de 40% au moins (en général, on utilise 50 à 80% de C+G), (c) il ne faut pas utiliser des séquences auto-complémentaires pour éviter la formation d'amorce dimère (Bowditch *et al.*, 1993).

En outre, il faut que certaines conditions soient remplies : (a) l'amorce doit reconnaître de façon assez spécifique une séquence de l'ADN, (b) l'amorce doit s'hybrider sur les deux brins de l'ADN, et (c) la distance entre les amorces sur les deux brins de l'ADN ne doit pas être trop grande (quelques milliers de bases).

La technique RAPD a l'avantage de ne pas nécessiter la connaissance préalable du génome étudié. Elle est facile à manipuler et ne requiert qu'une petite quantité d'ADN (Williams *et al.*, 1990 ; Welsh & McClelland, 1990). En revanche, la fréquence d'avoir une hybridation non spécifique est élevée étant donné que les amorces utilisées sont de petite taille et nécessitent donc une basse température d'hybridation. Par ailleurs, la reproductibilité des profils de bandes est très sensible aux conditions réactionnelles utilisées.

Chez les protozoaires, la technique RAPD a été utilisée pour étudier aussi bien les variabilités génétiques de différentes espèces telles que *Leishmania infantum* (Toledo *et al.*, 2002), ou *Entamoeba histolytica* (Gomes *et al.*, 2000), que les relations phylogénétiques de *Cryptosporidium* (Morgan *et al.*, 1999), de *Trypanosoma cruzi* (Gomes *et al.*, 1998). Elle a aussi été très utilisée pour identifier et caractériser des espèces et des souches de *Leishmania donovani* (Andresen *et al.*, 1996), de *Candida* (Lehmann *et al.*, 1992).

Elle a été aussi utilisée chez les mollusques du genre *Bulinus* (Langand *et al.*, 1993).

Chez les helminthes comme les genres *Trichinella* (Bandi *et al.*, 1995 ; Andrews *et al.*, 1995), les oxyures (Jobet *et al.*, 1998), les *Metastrongylus* (Leignel *et al.*, 1997), les Schistosomes (Barral *et al.*, 1993 ; Sire *et al.*, 1999), les *Dicrocoelium dendriticum* (Sandoval *et al.*, 1999), elle a permis de distinguer différentes souches. Chez les cestodes, elle a été utilisée pour des études intra spécifiques (Siles-Lucas *et al.*, 1993 ; Král'ová & Špakulová, 1996).

2. 4. – Etudes réalisées sur la biodiversité de *T. solium*

Les études sur la diversité génétique de *T. solium* sont rares. Rishi et McManus (1988) étaient probablement les premiers à rapporter l'existence de variations intra spécifiques chez des isolats de *T. solium* en utilisant la technique d'hybridation et de transfert par Southern. En travaillant sur la séquence nucléotidique des gènes mitochondriaux du cytochrome b (Cyt b) et de la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase (CO1), des équipes japonaises ont confirmé l'existence de cette diversité génétique au sein de l'espèce de *T. solium* (Okamoto *et al.*, 2001 ; Nakao *et al.*, 2002 ; Yamasaki *et al.*, 2002 ; Ito *et al.*, 2003). Ces équipes ont rapporté que *T. solium* peut être divisé en deux groupes génétiques : groupe asiatique d'une part et groupe africain et américain d'autre part. En combinant ces résultats aux données historiques sur la domestication et la distribution des porcs, et sur la colonisation, ils ont émis l'hypothèse que *T. solium* a été introduit récemment en Amérique Latine et en Afrique pendant la colonisation qui a commencé il y a environ 500 ans ; et qu'un *T. solium* d'une autre origine s'est dispersé indépendamment dans les pays asiatiques.

III – Travaux personnels

3. 1. – Objectifs

3. 1. 1. – Objectif principal

Montrer qu'il existe une diversité génétique au sein de l'espèce *Tænia solium*.

3. 1. 2. – Objectifs secondaires

Montrer que cette diversité génétique est liée à une répartition géographique.

Evaluer si cette variation intra spécifique est déterminante dans la localisation anatomique du parasite, influençant ainsi sa pathogénicité.

3. 2. – Etude réalisée au Mexique (publication 7)

Cette étude est réalisée en collaboration avec l'équipe de l'"Instituto de Investigaciones Biomedicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)" (Directeur : Dra Edda Sciutto).

3. 2. 1 – Matériels

Dans cette étude, nous avons analysé des échantillons de *T. solium* prélevés sur des porcs provenant du Mexique et de Madagascar.

Au Mexique, les porcs proviennent de deux régions :

Mexique Central : 35 cysticerques isolés sur 13 porcs provenant de deux Etats (Morelos et Puebla) ont été analysés. Les cysticerques de l'Etat de Morelos ont été recoltés dans deux localités (Zacatepec et Cuantepec), alors que ceux de l'Etat de Puebla ont été isolés de Huatlatlauca.

Sud Est du Mexique : 16 cysticerques prélevés sur 6 porcs ont été analysés. Ces cysticerques proviennent de la localité de Kochol dans l'Etat de Yucatan.

A Madagascar, 39 cysticerques prélevés sur 9 porcs ont été étudiés. Les cysticerques proviennent de deux provinces (Antananarivo et Fianarantsoa).

Un autre échantillon de *T. crassiceps* – ORF a été aussi analysé.

3. 2. 2 – Méthodes

L'ADN des cysticerques est extrait en utilisant le "Genomic Prep Cells and Tissues Isolation kit" (Amersham Biosciences), puis quantifié par spectrophotométrie.

La RAPD a été effectuée en utilisant le "Ready to Go RAPD Analysis Beads" (Amersham Biosciences) en suivant les instructions du fabricant avec 20 ng de l'extrait d'ADN et 9 amorces différentes. Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

- Amorce A01 : 5'-GGTGCGGGAA-3'
- Amorce A02 : 5'-GTTTCGCTCC-3'
- Amorce A03 : 5'-GTAGACCCGT-3'
- Amorce A04 : 5'-AAGAGCCCGT-3'
- Amorce A05 : 5'-AACGCGCAAC-3'
- Amorce A06 : 5'-CCCGTCAGCA-3'

- Amorces OPA-03 : 5'-AGTCAGCCAC-3'

- Amorces OPA-07: 5'-GAAACGGGTG-3'

- Amorces OPA13 : 5'-CAGCACCCAC-3'

Les amorces A01, A02, A03, A04, A05, A06 proviennent de Amersham Biosciences.
Les amorces OPA-03, OPA-07 et OPA-13 proviennent de Operon Technologies.

Les produits d'amplification sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 2% contenant du bromure d'éthidium à 0,8 ng/μl. L'électrophorèse est réalisée à 60 V pendant 3 heures 30 min. Les gels ont été ensuite photographiés et les photographies ont été scannées.

La détection de la présence ou d'absence de bandes a été effectuée pour chaque individu grâce au logiciel Gene Profile (Scanalytics, Fairfax, VA). Le profil d'amplification de chaque cysticerque est ensuite analysé dans Popgene (Yeh *et al.*, 1997).

3. 2. 3. – Résultats

Avec les 9 amorces, nous avons obtenu 113 loci dont 49 (43,36%) sont polymorphes. Les trois régions analysées (Madagascar, Mexique Centre et du Sud Est) sont bien séparées. Nous avons trouvé une différence génétique significative entre Madagascar et le Mexique, et entre les deux régions du Mexique. Cette différence est moindre entre les cysticerques provenant de différentes localités du Mexique. Aucune différence n'a été trouvée entre les cysticerques provenant des deux provinces de Madagascar, ainsi qu'entre les cysticerques prélevés sur un même animal.

Comme on s’y attendait, le flux génétique est faible entre les deux pays. En effet, la probabilité de migration des porteurs humains de ténia ainsi que le commerce de porcs entre Madagascar et le Mexique est faible étant donné la grande distance géographique entre ces deux pays. Le flux génétique est aussi faible entre les régions du Mexique. En revanche, entre les trois localités du Mexique Centre, nous avons trouvé un flux génétique élevé mais une faible différence génétique. La proximité géographique de ces localités favorise la migration de population et un commerce actif de porcs infectés entraînant ainsi un mélange de matériel génétique entre les parasites.

3. 3. – Etude réalisée à Limoges

3. 3. 1. – Matériels

3. 3. 1. 1. – Echantillons de *T. solium*

Les échantillons de *T. solium* provenant de différents pays sont obtenus auprès des différents collaborateurs de l’Institut d’Epidémiologie neurologique et de Neurologie Tropicale. Un protocole de prélèvement a été établi afin d’uniformiser la méthode de prélèvement des parasites (voir annexe 1).

Pour les échantillons d’origine porcine, les cysticerques viables sont prélevés dans différentes parties anatomiques de chaque animal (membres antérieur et postérieur, langue, cœur, masséter, diaphragme, cerveau) en faisant attention à ne pas prélever le tissu environnant afin d’étudier la relation éventuelle avec les manifestations cliniques de la maladie. Ils sont ensuite conservés dans de l’éthanol à 70%. Si on dispose de moyen de conservation à -20°C , un double de chaque échantillon est congelé et conservé à -20°C . Ces échantillons sont destinés aux études des isoenzymes.

Un échantillon de viande dépourvu de cysticerques et de graisse est aussi prélevé sur les porcs ladres et traité de la même manière que les cysticerques.

Pour les échantillons d'origine humaine, les cysticerques sous-cutanés ont été excisés chirurgicalement après que le sujet concerné ait donné son consentement. Nous n'avons pu obtenir qu'un cysticerque par individu.

Un échantillon de cysticerque provenant de Madagascar (MADA, voir annexe 2) est utilisé comme témoin positif car la technique a été mise au point avec cet échantillon.

Etant donnée la difficulté de disposer de l'azote liquide et de carboglace dans les pays où la maladie sévit, nous n'avons pu obtenir que 12 échantillons (10 échantillons provenant de Madagascar, 1 échantillon du Mexique, et 1 échantillon du Togo) pour l'étude des isoenzymes.

Cent neuf échantillons de cysticerques de *Tænia solium* d'origine porcine, 11 cysticerques d'origine humaine, ainsi que deux proglottis de *T. solium* adulte ont été analysés par la technique RAPD. La répartition de ces cysticerques par pays est la suivante :

- Madagascar, 37 échantillons ont été prélevés sur 22 porcs.
- Burundi, 15 échantillons prélevés sur 4 porcs et 7 échantillons d'origine humaine.
- Cameroun, 8 échantillons ont été obtenus sur 4 porcs.
- Mexique, 49 échantillons provenant de 14 porcs.
- Equateur, 7 échantillons de cysticerques provenant de 6 porcs et deux proglottis de *T. solium* adulte isolés chez deux hommes.
- Togo, 4 cysticerques d'origine humaine. Il est à noter que les cysticerques d'origine humaine provenant du Togo ont été conservés dans du formol et non dans de l'éthanol comme les autres échantillons.

Les proglottis de *T. solium* ont été identifiés par des critères biochimiques (isoenzymes), génétiques (PCR) et morphologiques (nombre de ramifications utérines).

Pour les cysticerques d'origine humaine, aucune autre preuve que des critères morphologiques n'ont été apportés.

Des échantillons de tissu ont été aussi prélevés chez l'hôte afin de servir de témoin négatif.

La liste des échantillons analysés dans cette étude est représentée dans l'annexe 2.

3. 3. 1. 2. – Echantillons de *T. saginata*

Dix échantillons de *T. saginata* dont 8 ont été obtenus auprès du laboratoire de Parasitologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Dupuytren de Limoges et 2 nous ont été gracieusement donné par le Professeur Washington Benitez du "Centro Internacional de Zoonosis" de Quito en Equateur.

Les proglottis de *T. saginata* ont été identifiés par des critères morphologiques à savoir le nombre de ramifications utérines, le nombre et l'alternance des pores génitaux.

3. 3. 1. 3. – Origine géographique des échantillons

◆ Les échantillons provenant de Madagascar provenaient de deux provinces

- Antananarivo : 20 porcs

- Fianarantsoa : 2 porcs

◆ Au Burundi, les 4 porcs sur lesquels les cysticerques ont été prélevés provenaient tous de la province de Kayanza. Les prélèvements humains ont été obtenus lors d'une enquête sur une étude épilepsie / cysticercose effectuée dans la même région.

◆ Nous n'avons aucune information sur la provenance des porcs prélevés au Cameroun.

◆ Au Mexique, les différents porcs provenaient de trois Etats

- Etat de Morelos : 7 porcs provenaient de la ville de Zacatepec et 3 autres provenaient de la ville de Cuentepec,

- Etat de Puebla : 2 porcs ont été obtenus de la ville de Huatlatlahuaca,

- Etat de Yucatan : les 2 porcs provenaient de la ville de Kochol.

◆ Nous n'avons aucune information concernant la localisation anatomique ni la provenance des cysticerques provenant d'Equateur. Quant aux deux vers adultes de *T. solium*, l'un a été isolé chez une personne habitant la ville d'Atuntaqui (province d'Imbabura) et l'autre la ville de Quito (province de Pichincha). Les deux *T. saginata* proviennent de la ville de Bolivari (province de Carchi) et de la ville de Quito (province de Pichincha).

Le tableau 1 résume l'espèce, le nombre, l'origine géographique, l'hôte chez lequel on a prélevé l'échantillon, ainsi que le stade évolutif des échantillons.

Tableau 1 : Origine des échantillons de *Taenia* spp. étudiés

Espèces	Origine	Ville, Province	Hôte (Nb)	Nb échantillons analysés	Stade
<i>T. solium</i>	Madagascar	Antananarivo	porc (20)	35	cysticerques
		Fianarantsoa	porc (2)	2	cysticerques
<i>T. solium</i>	Burundi	Kayanza	homme (7)	7	cysticerques
		Kayanza	porc (4)	15	cysticerques
<i>T. solium</i>	Cameroun		porc (4)	8	cysticerques
<i>T. solium</i>	Mexique	Zacatepec, Morelos	porc (7)	49	cysticerques
		Cuantepec, Morelos	porc (3)		
		Huatlatlahuaca, Puebla	porc (2)		
		Koshol, Yucatan	porc (2)		
<i>T. solium</i>	Equateur	Atuntaqui, Imbabura	homme (1)	1	proglottis
		Quito, Pichincha	homme (1)	1	proglottis
			porc (6)	7	cysticerques
<i>T. solium</i>	Togo		homme (4)	4	cysticerques
<i>T. saginata</i>	France	Limoges, France	homme (8)	8	proglottis
<i>T. saginata</i>	Equateur	Bolivari, Carchi	homme (1)	1	proglottis
		Quito, Pichincha	homme (1)	1	proglottis

3. 3. 2. – Méthodes

3. 3. 2. 1. – Isoélectrofocalisation

3. 3. 2. 1. 1. – Préparation des extraits de parasite

Chaque cysticerque est broyé dans 50 µl de solution d'homogénéisation (EDTA 1 mM – Acide aminocaproïque 1 mM – DTT 1mM) afin de conserver les activités biochimiques des enzymes. Les extraits de parasites sont ensuite aliquotés par 12 µl et gardés à –80°C jusqu'à l'analyse.

3. 3. 2. 1. 2. – Enzymes étudiées

Dans un premier temps, 22 enzymes ont été sélectionnées à partir des enzymes qui ont déjà été testées au laboratoire de Parasitologie du CHU Dupuytren de Limoges pour l'étude de *Toxoplasma gondii*. Sur les 22 enzymes étudiées, neuf ont été retenues pour les études ultérieures car elles donnaient des bandes claires et reproductibles. Les autres enzymes, ne présentant pas de bandes ou étant difficilement interprétables, ont été éliminées. Les neuf enzymes retenues sont : Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PDH, E.C.1.1.1.49), Lactate déshydrogénase (LDH, E.C.1.1.1.27), Hexokinase (HK, E.C.2.7.1.1), Adénylate kinase (AK, E.C.2.7.4.3), Aldolase (ALD, E.C.4.1.2.13), Phosphoglucomutase (PGM, E.C.2.7.5.1), Malate déshydrogénase (MDH, E.C.1.1.1.37), Malic Enzyme (ME, E.C.1.1.1.40) et 6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD, E.C.1.1.1.43).

3. 3. 2. 1. 3. – Electrophorèse

L'électrophorèse est effectuée soit sur gel de polyacrylamide, soit sur gel d'agarose d'environ 5 mm d'épaisseur. La nature du gel utilisé en fonction de l'enzyme étudiée est décrite dans le tableau 2. Pour éviter la surchauffe du gel et préserver l'activité biochimique des enzymes, l'appareil d'électrophorèse est relié à un circuit de réfrigération réglé à 6°C.

◆ Gel de polyacrylamide

Le gel de polyacrylamide est préparé comme décrit dans l'annexe 4. Le gel est ensuite démoulé puis monté sur l'appareil d'électrophorèse en suivant les instructions fournies avec l'appareil pour un gel de polyacrylamide. Après avoir réglé les paramètres de migration ($U = 2000 \text{ V}$; $I = 50 \text{ mA}$; Puissance constante = 25 W), l'appareil est branché et une pré focalisation de 20 min est effectuée. Le courant est arrêté et 10 μl de chaque solution d'extrait de parasite sont déposés sur le gel. L'appareil est de nouveau branché et la migration est réalisée pendant encore une heure (annexe 5).

◆ Gel d'agarose

Le gel d'agarose est préparé comme décrit dans l'annexe 4. Le montage est fait en suivant les instructions fournies avec l'appareil pour un gel d'agarose. Après avoir épongé le gel à l'aide de papier absorbant, 10 μl de chaque extrait de parasites sont ensuite déposés sur le gel. Les paramètres de migration sont réglés à 1500 V pour le voltage, 50 mA pour l'intensité et 15 W pour la puissance (constante). La migration est ensuite poursuivie pendant environ 1 heure 20 min (annexe 5).

Le tableau 2 résume la composition de la solution d'homogénéisation ainsi que le type de gel utilisés en fonction de l'enzyme à étudier.

Tableau 2 : Nature du gel et composition de la solution d'homogénéisation en fonction de l'enzyme étudiée.

Enzymes	Code	Gels / pH	Solution d'homogénéisation
Glucose-6-Phosphate déshydrogénase (G6PDH)	E.C.1.1.1.49	AGAR / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Lactate déshydrogénase (LDH)	E.C.1.1.1.27	AGAR / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Hexokinase (HK)	E.C.2.7.1.1	PAG / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Adénylate kinase (AK)	E.C.2.7.4.3	PAG / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Aldolase (ALD)	E.C.4.1.2.13	PAG / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Phosphoglucomutase (PGM)	E.C.2.7.5.1	PAG / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Malate déshydrogénase (MDH)	E.C.1.1.1.37	PAG / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
Malic Enzyme (ME)	E.C.1.1.1.40	AGAR / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)
6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD)	E.C.1.1.1.43	AGAR / 3-10	EDTA – Acide aminocaproïque – DTT (1mM)

PAG : gel de polyacrylamide

AGAR : gel d'agarose

EDTA : acide éthylène diamine tetra acétique

DTT : dithiothréitol

3. 3. 2. 1. 4. – Révélation

Lorsque l'électrophorèse est terminée, le gel est mis à incuber dans une solution contenant des réactifs spécifiques à chaque enzyme jusqu'à l'apparition des bandes (annexe 6). Puis le gel est mis dans une solution de fixation (acide acétique 7%) pendant 30 min, ensuite dans une solution contenant de l'éthanol et de l'acide acétique (25% et 8% respectivement) pour enlever l'excès de coloration. Il est ensuite laissé sécher à l'air.

3. 3. 2. 2. – RAPD

3. 3. 2. 2. 1. – Extraction d'ADN

L'ADN de chaque échantillon est extrait en utilisant le "GenomicPrep™ Cells and Tissue DNA isolation kit" (Amersham Biosciences). Brièvement, le matériel parasite ou le tissu (environ 20 mg) est broyé à l'aide d'un petit piston dans un tube type Eppendorf contenant 600 µl de la solution de lyse refroidie dans de la glace pilée. Après avoir ajouté 5 µl de protéinase K à 10 mg/ml (annexe 7), les tubes sont incubés à 56°C pendant toute la nuit. Puis, 5 µl de RNase A sont ajoutés avant une incubation à 37°C pendant 30 min. Les tubes sont ensuite mis pendant quelques minutes dans de la glace pilée pour abaisser la température et 200 µl de la solution de précipitation de protéines sont ajoutés. Après avoir vortexé quelques secondes, ils sont centrifugés pendant 3 min à 16 000 g et à +4°C. Le surnageant est versé dans un autre tube stérile contenant 600 µl d'iso-propanol. Après avoir mélangé par environ 50 retournements, les tubes sont centrifugés de nouveau à 16 000 g et à 4°C pendant 3 min. Puis, le surnageant est jeté et les tubes sont laissés à égoutter quelques minutes sur du papier absorbant propre. Six cents µl d'éthanol à 70 % sont alors ajoutés ; puis, les tubes sont

retournés plusieurs fois pour laver le culot d'ADN. Après une autre centrifugation à 16 000 g et à +4°C pendant 3 min, le surnageant est jeté et les tubes sont mis à égoutter pendant quelques instants sur du papier absorbant avant d'être laissés sécher à l'air pendant environ 15 min. Le culot d'ADN est ensuite dissout dans 50 µl de la solution d'hydratation. Si le précipité n'est pas complètement dissout, 50 µl de solution d'hydratation sont ajoutés. Pour dissoudre complètement l'ADN, les tubes sont incubés à 65°C pendant 15 min.

Remarque : A l'exception de la protéinase K, de l'iso-propanol et de l'éthanol, toutes les solutions utilisées sont incluses dans le kit d'extraction.

3. 3. 2. 2. 2. – Quantification de l'extrait d'ADN

La solution d'ADN est ensuite quantifiée sur gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) contenant du bromure d'éthidium à 0,5 µg/ml (annexe 8). Le bromure d'éthidium est un agent intercalant et fluorescent qui permet de visualiser l'ADN sous lumière UV. La solution d'ADN est diluée en série. Dix µl de chaque dilution sont mélangés à 1 µl de la solution de charge (10X) (annexe 7), puis déposés dans un puits du gel. Parallèlement, 6 µl des solutions standards à concentrations connues (Life technologies) sont déposées dans le gel. La migration est ensuite réalisée pendant 45 min à 75 volts (annexe 8). L'intensité de la fluorescence obtenue est proportionnelle à la quantité d'ADN présente dans la solution. La concentration de l'ADN à quantifier est calculée en comparant l'intensité de sa bande avec celles des standards. Cette concentration est ensuite ajustée à 6 – 8 ng/µl. Les solutions d'ADN peuvent être gardées à +4°C pendant quelques mois. Pour une conservation plus longue, elles doivent être conservées à -20°C.

Nous avons choisi de quantifier l'ADN de cette manière car elle permet aussi de se rendre compte de l'état de l'ADN extrait (dégradation ou non).

Notons que nous n'avons pas pu obtenir de l'ADN à partir des échantillons de cysticerques provenant du Togo.

3. 3. 2. 2. 3. – Amplification

◆ Amorces

Les amorces sont des séquences de 10 oligonucléotides contenant 60 à 70 % de C+G. Elles ont été choisies arbitrairement. Nous avons choisi d'utiliser les amorces provenant des kits A et B commercialisés par Quantum Appligene. Sur 32 amorces testées, 15 ont été utilisées pour cette étude.

◆ Conditions d'amplification

Pour chaque amorce utilisée, les conditions optimales de la réaction sont déterminées en faisant varier les différents paramètres pouvant influencer l'analyse (température d'hybridation, concentration en ADN, concentration en $MgCl_2$, et nombre de cycles effectués). Pour les 15 amorces retenues pour l'étude, les conditions sont les mêmes à part la concentration en $MgCl_2$. Ces conditions sont, pour un volume réactionnel de 50 μ l, les suivantes :

- 10 mM Tris HCl pH 9
- 50 mM KCl
- 0,2 mM chacun de dATP, dCTP, dGTP et dTTP
- 2 Unités de Taq DNA polymérase

- 0,8 μM d'amorce

- 6 – 8 ng d'ADN.

Le tampon d'amplification de la Taq DNA polymérase fournit le Tris HCl, le KCl et 1,5 mM de MgCl_2 . Si une concentration élevée en MgCl_2 est nécessaire, celle-ci est ajustée en ajoutant une quantité suffisante de MgCl_2 à 25 mM également fournie avec la Taq DNA polymérase.

La concentration en MgCl_2 utilisée pour chaque amorce est indiquée dans le tableau 3.

Pour que la composition de la solution réactionnelle soit homogène pour les différents échantillons testés ensemble, une solution globale MIX est préparée comme décrit dans l'annexe 10. Quarante-neuf μl de cette solution MIX sont mis dans des tubes d'amplification. Puis, 1 μl de la solution d'ADN (6 à 8 ng/ μl) à amplifier est ajouté.

Un témoin négatif d'amplification est inclus dans chaque analyse. Pour ce témoin, la solution d'ADN est remplacée par 1 μl de H_2O .

Le tableau 3 montre la séquence des amorces utilisées ainsi que la concentration en MgCl_2 correspondante.

Tableau 3 : Séquences et concentrations en MgCl₂ des amorces utilisées en RAPD

Amorces	Séquences 5'-3'	[MgCl ₂] en mM
A02	5'-TGCCGAGCTG-3'	2,0
A03	5'-AGTCAGCCAC-3'	1,5
A04	5'-AATCGGGCTG-3'	2,0
A07	5'-GAAACGGGTG-3'	1,5
A13	5'-CAGCACCCAC-3'	1,5
B01	5'-GTTTCGCTCC-3'	2,0
B04	5'-GGACTGGAGT-3'	2,0
B05	5'-TGCGCCCTTC-3'	2,0
B06	5'-TGCTCTGCCC-3'	1,5
B07	5'-GGTGACGCAG-3'	2,0
B08	5'-GTCCACACGG-3'	1,5
B09	5'-TGGGGGACTC-3'	2,5
B12	5'-CCTTGACGCA-3'	1,5
B13	5'-TTCCCCGCT-3'	2,0
B16	5'-TTTGCCCGGA-3'	2,0

◆ Programmation de l'appareil

Deux appareils ont été utilisés pour l'amplification :

- DNA Thermal cycler 480 (Perkin Elmer) ; la programmation utilisée avec cet appareil est la suivante :

94°C pendant 5 min,

45 cycles de 94°C pendant 1 min, 36°C pendant 1min, 72°C pendant 2 min,

72°C pendant 10 min.

Maintien à +4°C jusqu'à l'arrêt de l'appareil.

Avec cet appareil, l'échantillon à amplifier est recouvert d'une goutte d'huile minérale pour éviter l'évaporation.

- GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) dont la programmation est :

94°C pendant 5 min,

45 cycles de 94°C pendant 30 sec, 36°C pendant 30 sec, 72°C pendant 1 min,

72°C pendant 7 min.

Maintien à 4°C jusqu'à l'arrêt de l'appareil.

Les produits d'amplification peuvent être conservés à 4°C si la migration se fait dans les 24 heures suivant l'amplification. Sinon, ils sont conservés à -20°C.

3. 3. 2. 2. 4. – Electrophorèse des produits d'amplification

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium (annexe 9). Quinze µl de produits d'amplification sont mélangés à 3 µl de solution de charge (6X) (Sigma) puis déposés dans un puits du gel. Un puits est réservé au témoin de poids moléculaire PM (2 µl de PM + 3 µl solution de charge 6X + 13 µl tampon TBE). L'ADN amplifié est soumis à migration pendant 2 heures 45 min à 50 volts (annexe 9). Le gel est ensuite observé sous lumière UV, photographié en utilisant un appareil BioCaptMW (Vilbert Lourmat, France).

3. 3. 2. 2. 5. – Analyse des données

Les bandes sont détectées en utilisant le logiciel Bio1D++ (Vilbert Lourmat, France). Le poids moléculaire de chaque bande est calculé par rapport à un standard de poids moléculaires connus. Pour chaque amorce, les profils des différents échantillons sont comparés en utilisant le logiciel Bio1D++. Un dendrogramme est ensuite construit en considérant les coefficients d'homologie de Nei et Li (Dice) avec un intervalle de confiance de 5% pour la taille des bandes.

Une analyse factorielle des correspondances a été aussi effectuée sur l'ensemble de données. Cette analyse a été réalisée grâce au logiciel Genetix[®] version 4.04 (Berkhir *et al.*, 2002)

3. 3. 3. – Résultats

3. 3. 3. 1. – Isoenzymes

Parmi les neuf enzymes étudiées, seule l'adénylate kinase (E. C. 2. 7. 4. 3) nous a permis de voir une différence entre la souche provenant du Togo et celles provenant du Mexique et de Madagascar. Les différents échantillons provenant de Madagascar n'ont pas montré de diversité avec les systèmes enzymatiques étudiés.

3. 3. 3. 2. – RAPD

Les échantillons provenant du Togo n'ont pas pu être analysés par cette technique car nous n'avons pas pu obtenir de l'ADN après extraction. Les ADN ont été dégradés.

3. 3. 3. 2. 1. – Reproductibilité

Les bandes de forte intensité ont une très bonne reproductibilité alors que les bandes de faible intensité ne sont pas toujours retrouvées d'une série à une autre.

Pour les différentes amorces retenues, on obtient :

- un profil identique pour le même extrait d'ADN amplifié dans la même série.
- le même profil de bandes pour les extraits d'ADN provenant d'échantillons différents prélevés sur le même individu et à la même localisation.
- le même profil de bandes pour le même extrait d'ADN amplifié par les deux appareils.

◆ Pour l'amorce A02, les bandes de faible intensité sont reproductibles à 80% (4 fois sur 5).

- ◆ Pour l'amorce A03, la reproductibilité est de 75% (6 fois sur 8).
- ◆ Pour l'amorce A07, la reproductibilité est de 75% (3 fois sur 4).
- ◆ Pour l'amorce A13, elle est de 86% (6 fois sur 7).
- ◆ Pour l'amorce B01, les bandes ont une reproductibilité de 100% (3 fois sur 3).

Les bandes de faible intensité, montrant une faible reproductibilité, ne sont pas prises en compte pour les différentes comparaisons.

3. 3. 3. 2. 2. – Amorces

Sur les quinze amorces testées, six ont permis de détecter des polymorphismes dans les profils de bandes. Ce sont les amorces A02, A03, A04, A07, A13, et B01. Toutefois, l'amorce A04 ne sera pas prise en compte pour la suite des analyses car elle montre une très faible reproductibilité. Même les bandes principales de forte intensité ne sont pas toujours reproductibles. Les différences observées pourraient alors provenir de la technique et ne pas être le reflet d'une diversité intra spécifique.

Nous avons noté que les profils générés par les différentes amorces sont bien distincts d'une amorce à une autre.

Pour l'interprétation des profils, nous avons considéré que chaque bande représente un « locus ».

3. 3. 3. 2. 3. – Types de profils obtenus

Pour chaque amorce, les types de profils sont notés en chiffres romains à partir de I, mais le type I de l'amorce A02 est différent du type I de l'amorce A03, etc...

◆ Amorce A02 : deux types de profils (types I et II) ont été obtenus avec les échantillons de *T. solium* et trois types de profils (types III à V) avec ceux de *T. saginata*. Les échantillons provenant du tissu n'ont donné qu'un seul type de profil différent de ceux obtenus avec *T. solium* et *T. saginata* (type TA02). Ces différents profils sont représentés sur la figure 6.

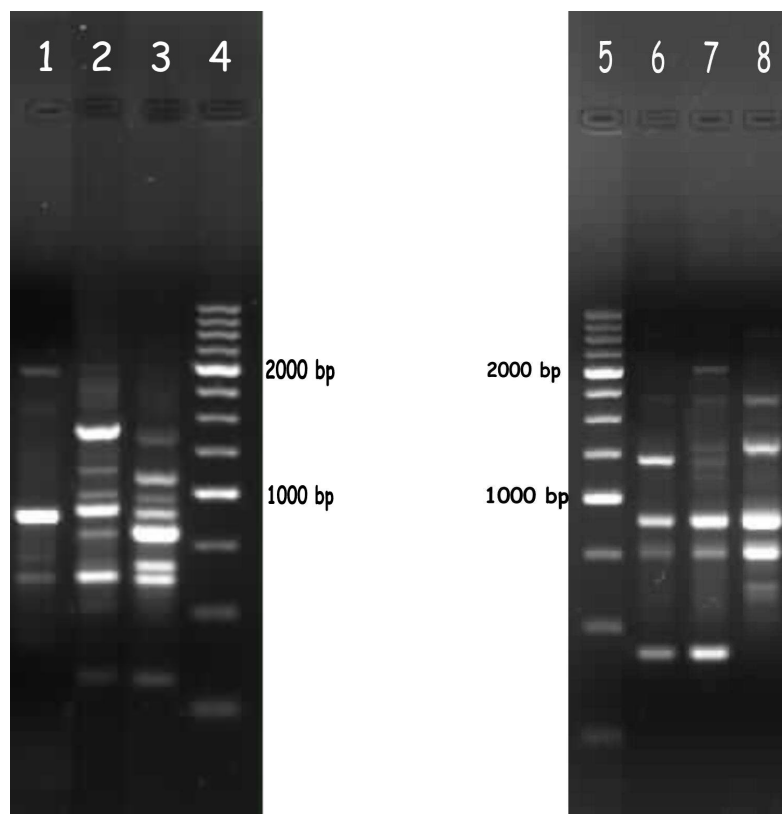
◆ Amorce A03 : quatre profils différents (types I à IV) ont été observés pour les échantillons de *T. solium* et deux autres profils (types V et VI) pour ceux de *T. saginata*. Les échantillons de tissu ont donné un profil différent (type TA03). La figure 7 montre les différents profils obtenus par l'amorce A03.

◆ Amorce A07 : les échantillons de *T. solium* et de *T. saginata* ont montré respectivement six (types I à VI) et deux profils différents (types VII et VIII). Les tissus n'ont donné qu'un seul type de profil (type TA07). Ces différents profils sont montrés sur la figure 8.

◆ Amorce A13 : nous avons observé cinq profils différents (types I à V) pour *T. solium* et trois profils (types VI à VIII) pour *T. saginata*. L'analyse des tissus n'a générée qu'un type de profil (type TA13). Ces profils sont représentés sur la figure 9.

◆ Amorce B01 : trois profils différents (types I à III) ont été générés par *T. solium* et cinq autres (types IV à VIII) par *T. saginata*. Les échantillons de tissu ont donné un autre type de profil (type TB01). Les différents profils obtenus avec l'amorce B01 sont montrés sur la figure 10.

Figure 6 : Les différents profils obtenus par l'amorce A02 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : Profil des tissus, type TA02 (échantillon MG-119-T01)

2 : Profil de type I (échantillon MADA)

3 : Profil de type II (échantillon EC-P07-C01)

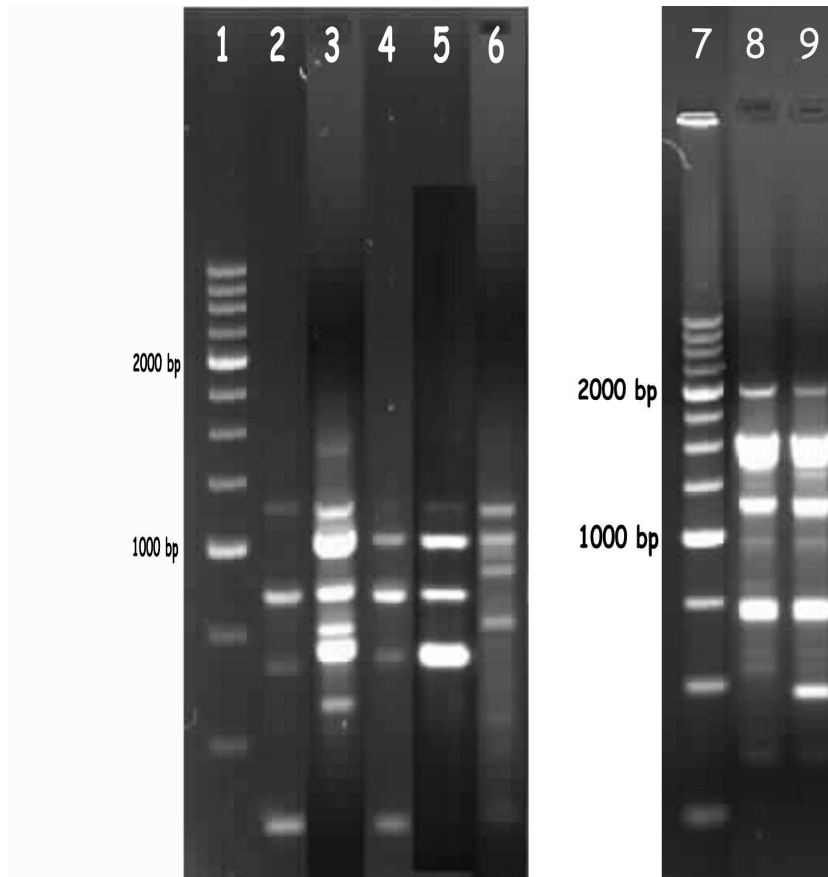
4 et 5 : PM 250 bp-ladder

6 : Profil de type III (échantillon TSAG-09)

7 : Profil de type IV (échantillon TSAG-06)

8 : Profil de type V (échantillon TSAG-07).

Figure 7 : Les différents profils obtenus par l'amorce A03 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 et 7 : PM 250 bp-ladder

2 : Profil de type I (échantillon MADA)

3 : Profil de type II (échantillon BU-P04-C05)

4 : Profil de type III (échantillon CM-P03-C01)

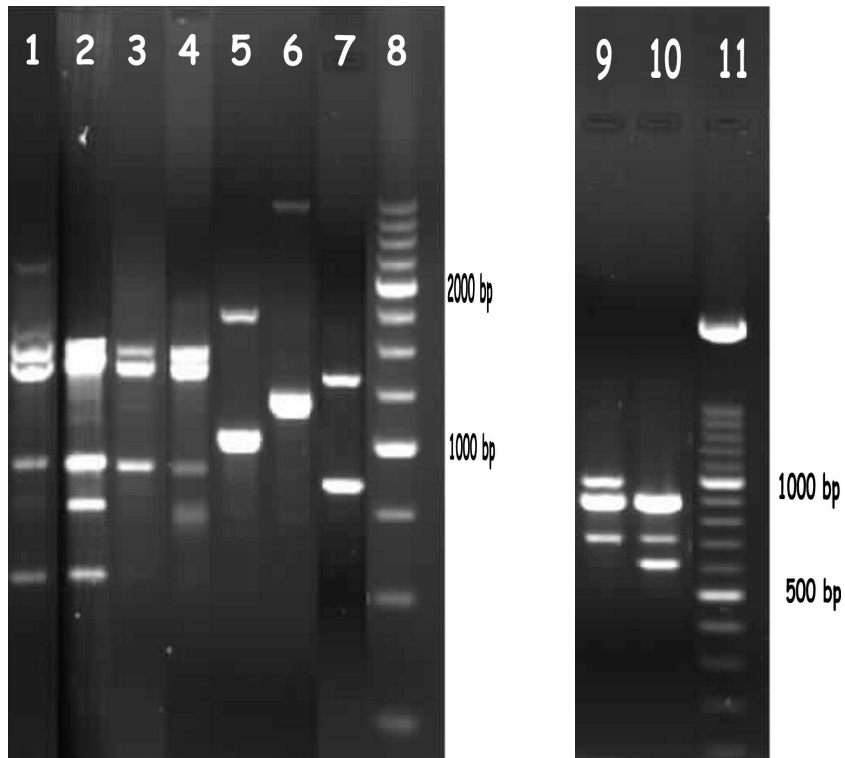
5 : Profil de type IV (échantillon MX-P07-C06)

6 : Profil des tissus, type TA03 (échantillon BU-P04-T04)

8 : Profil de type V (échantillon TSAG-02)

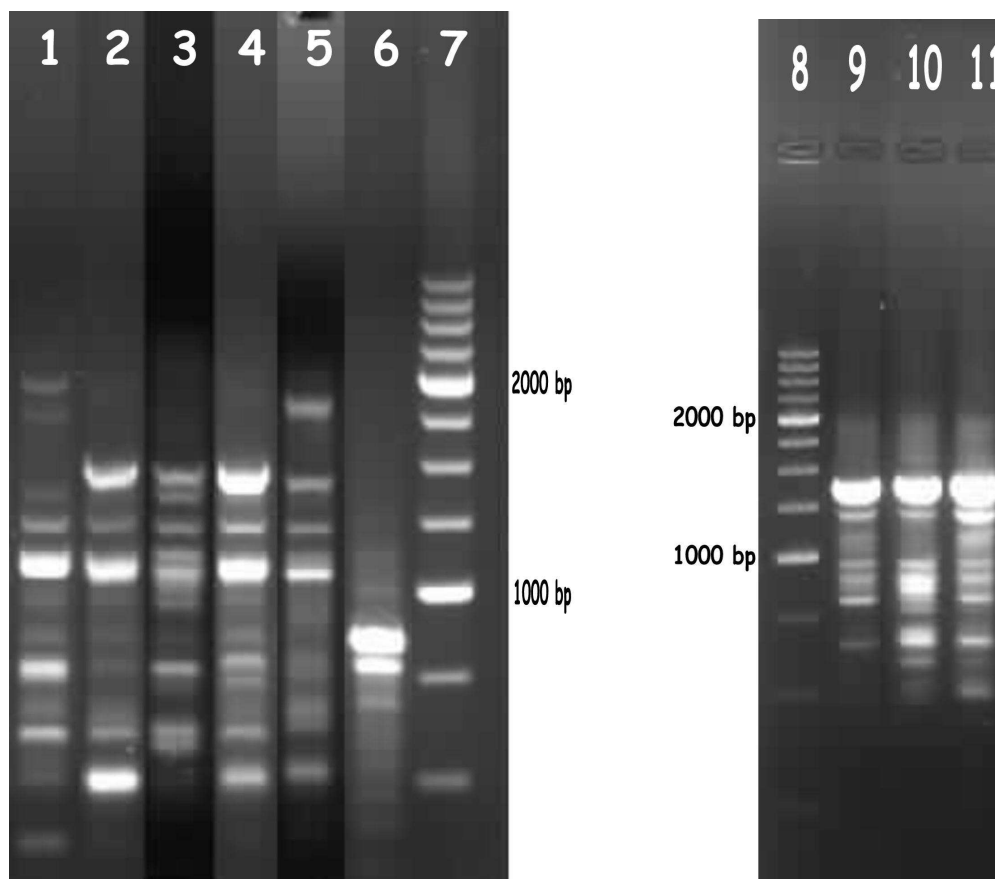
9 : Profil de type VI (échantillon TSAG-03).

Figure 8 : Les différents profils obtenus par l'amorce A07 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : Profil de type I (MG-111-C01)
- 2 : Profil de type II (BU-P04-C01)
- 3 : Profil de type III (MX-P05-C01)
- 4 : Profil de type IV (EC-P02-C01)
- 5 : Profil de type V (MX-P12-C04)
- 6 : Profil de type VI (MX-P13-C03)
- 7 : Profil des tissus, type TA07 (MG-120-T01)
- 8 : PM 250 bp-ladder
- 9 : Profil de type VII (TSAG-06)
- 10 : Profil de type VIII (TSAG-07)
- 11 : PM 100 bp-ladder

Figure 9 : Les différents profils obtenus par l'amorce A13 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : Profil de type I (échantillon MADA)

2 : Profil de type II (échantillon BU-P04-C05)

3 : Profil de type III (échantillon CM-P04-C02)

4 : Profil de type IV (échantillon MX-P16-C02)

5 : Profil de type V (échantillon EC-P02-C01)

6 : Profil des tissus, type TA13 (BU-P04-T04)

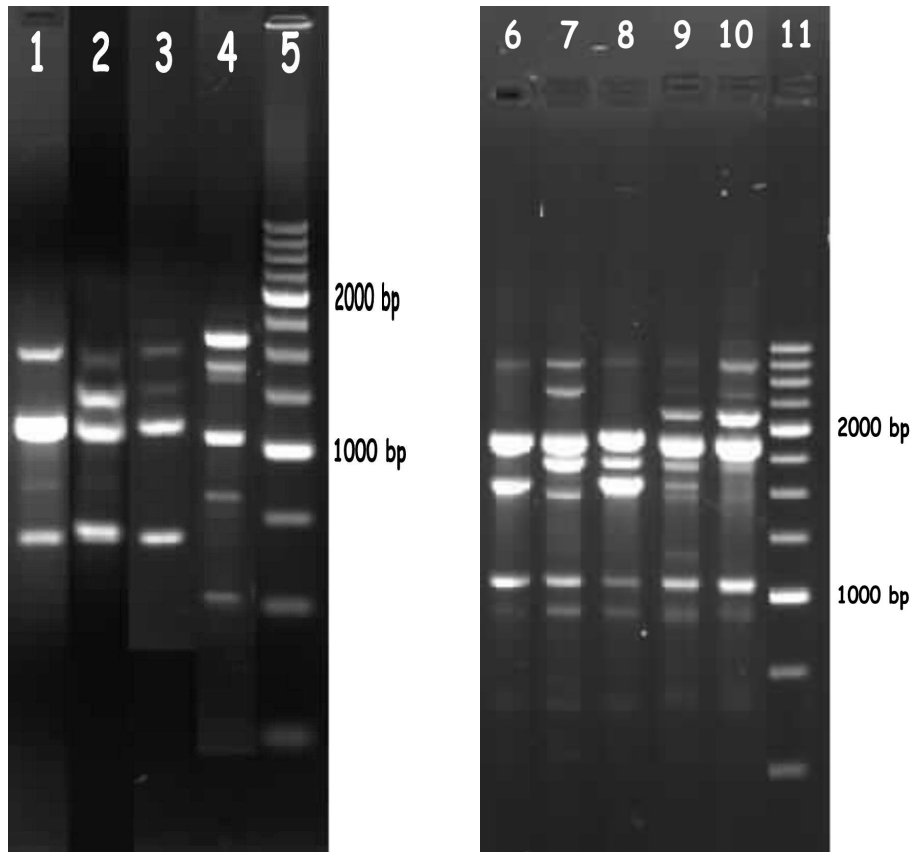
7 et 8 : PM 250 bp-ladder

9 : Profil de type VI (échantillon TSAG-01)

10 : Profil de type VII (échantillon TSAG-04)

11 : Profil de type VIII (échantillon TSAG-06)

Figure 10 : Les différents profils obtenus par l'amorce B01 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : Profil de type I (échantillon MG-108-C01)
- 2 : Profil de type II (échantillon MX-P07-C06)
- 3 ; Profil de type III (échantillon CM-P02-C01)
- 4 : Profil des tissus, type TB01 (échantillon MX-P15-T)
- 5 et 11 : PM 250 bp-ladder
- 6 : Profil de type IV (échantillon TSAG-01)
- 7 : Profil de type V (échantillon TSAG-04)
- 8 : Profil de type VI (échantillon TSAG-03)
- 9 : Profil de type VII (échantillon TSPP-02)
- 10 : Profil de type VIII (échantillon TSPP-03)

Les différents types de profils obtenus par chaque amorce sont bien distincts de ceux des autres amorces.

Les tableaux 4 et 5 représentent la répartition des différents types de profils obtenus pour chaque échantillon et par amorce.

Trois échantillons (MX-P12, MX-P13 et MX-P14) n'ont pas pu être typés par les amorces A02, A03, A13 et B01 car ils montrent des profils différents entre eux et entre les différentes localisations anatomiques. De plus, les profils qu'ils génèrent sont différents des profils observés chez les autres échantillons. Toutefois avec A07, seul l'échantillon MX-P14 n'a pas pu être classé pour les mêmes raisons.

Par ailleurs, les échantillons BU-93, BU-105, BU-110, BU-114, BU-117, et BU-175 ne sont pas considérés car leur profil est identique au profil du tissu.

Tableau 4 : Type de profils trouvés par amorce chez *Taenia solium* (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)

Pays	Echantillons	A02	A03	A07	A13	B01
MADAGASCAR	MADA	I	I	I	I	I
	MG-101	II	I	I	I	I
	MG-102	I	I	I	I	I
	MG-103	I	I	I	I	I
	MG-104	I	I	I	I	I
	MG-105	I	I	I	I	I
	MG-106	II	II	II	II	II
	MG-107	I	I	I	I	I
	MG-108	I	I	I	I	I
	MG-109	I	I	I	I	I
	MG-110	II	IV	III	II	II
	MG-111	I	I	I	I	I
	MG-112	I	I	I	I	I
	MG-113	II	II	IV	II	II
	MG-114	I	I	III	I	I
	MG-115	I	I	I	I	I
	MG-116	I	I	I	I	I
	MG-117	I	I	I	I	I
	MG-118	I	I	I	I	I
	MG-119	I	I	I	I	I
	MG-120	I	I	I	I	I
	MG-121	I	I	I	I	I
MG-122	I	I	I	I	I	
BURUNDI	BU-P01	II	II	II	II	II
	BU-P02	II	II	II	II	II
	BU-P03	II	II	II	II	II
	BU-P04	II	II	II	II	II
	BU-63	II	IV	II	II	II
CAMEROUN	CM-P02	II	III	II	III	III
	CM-P03	II	III	II	III	III
	CM-P04	II	III	II	III	III
	CM-P05	II	III	II	III	III

Pays	Echantillons	A02	A03	A07	A13	B01	
MEXIQUE	MX-P03	II	IV	IV	IV	II	
	MX-P04	II	IV	III	IV	II	
	MX-P05	II	IV	III	IV	II	
	MX-P06	II	IV	III	IV	II	
	MX-P07	II	IV	III	IV	II	
	MX-P08	II	IV	III	IV	II	
	MX-P09	II	IV	III	IV	II	
	MX-P10	II	IV	III	IV	II	
	MX-P11	II	IV	III	IV	II	
	MX-P12	?	?	V	?	?	
	MX-P13	?	?	VI	?	?	
	MX-P14	?	?	?	?	?	
	MX-P15	II	IV	IV	IV	II	
	MX-P16	II	IV	IV	IV	II	
	EQUATEUR	EC-P02	II	IV	IV	V	II
		EC-P03	II	IV	IV	V	II
EC-P04		II	IV	IV	V	II	
EC-P05		II	IV	IV	V	II	
EC-P06		II	IV	IV	V	II	
EC-P07		II	IV	IV	V	II	
TSPP-01		II	IV	IV	V	II	
TSPP-04		II	IV	IV	V	II	

? : profil atypique

Tableau 5 : Type de profils trouvé pour chaque amorce chez *Taenia saginata* (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)

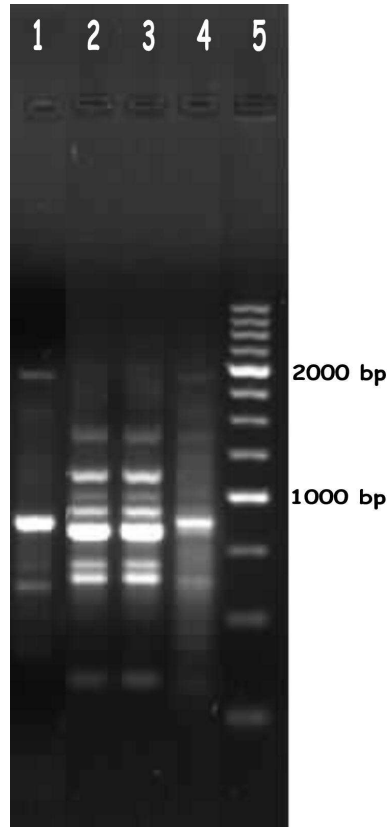
Pays	Echantillons	A02	A03	A07	A13	B01
FRANCE	TSAG-01	III	V	VIII	VI	IV
	TSAG-02	III	V	VIII	VI	V
	TSAG-03	III	VI	VIII	VI	VI
	TSAG-04	III	VI	VIII	VII	V
	TSAG-06	IV	V	VII	VIII	V
	TSAG-07	V	V	VIII	VI	V
	TSAG-08	III	V	VIII	VI	V
	TSAG-09	III	V	VIII	VI	VI
EQUATEUR	TSPP-02	III	V	VIII	VI	VII
	TSPP-03	III	V	VIII	VI	VIII

3. 3. 3. 2. 4. – Effet de la calcification des cysticerques

Lorsque le cysticerque est en cours de calcification ou complètement calcifié, le profil obtenu montre soit une superposition du profil du cysticerque avec celui de l'hôte, soit uniquement le profil de l'hôte.

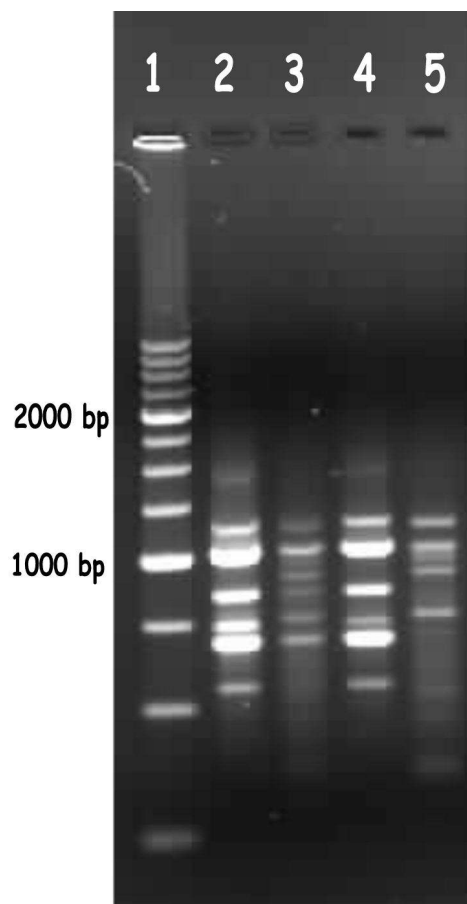
Par ailleurs, certains échantillons ne sont pas calcifiés ni en cours de calcification, pourtant leurs profils sont identiques à celui des tissus ou montrent une superposition de bandes du tissu avec ceux du parasite. L'explication probable est que les échantillons sont contaminés par les tissus de l'hôte. En fonction de l'importance de la contamination, les profils ressembleront plus ou moins à ceux du tissu. C'est le cas pour la plupart des échantillons prélevés dans le cerveau car il est très difficile pour les localisations cérébrales d'obtenir des cysticerques exempts du tissu cérébral. Les figures 11, 12, 13, 14, et 15 montrent respectivement les profils obtenus avec les amorces A02, A03, A07, A13 et B01.

Figure 11 : Effet de l'état du cysticerque sur les profils obtenus par A02 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : MG-119-T01 – Tissu (type TA02)
- 2 : MX-P15-C01 – Membre postérieur (type II)
- 3 : MX-P15-C02 – Membre antérieur (type II)
- 4 : MX-P15-C03 – Cerveau (Profil du tissu)
- 5 : PM 250 bp-ladder

Figure 12 : Effet de l'état du cysticerque sur les profils obtenus par A03 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : PM 250 bp-ladder

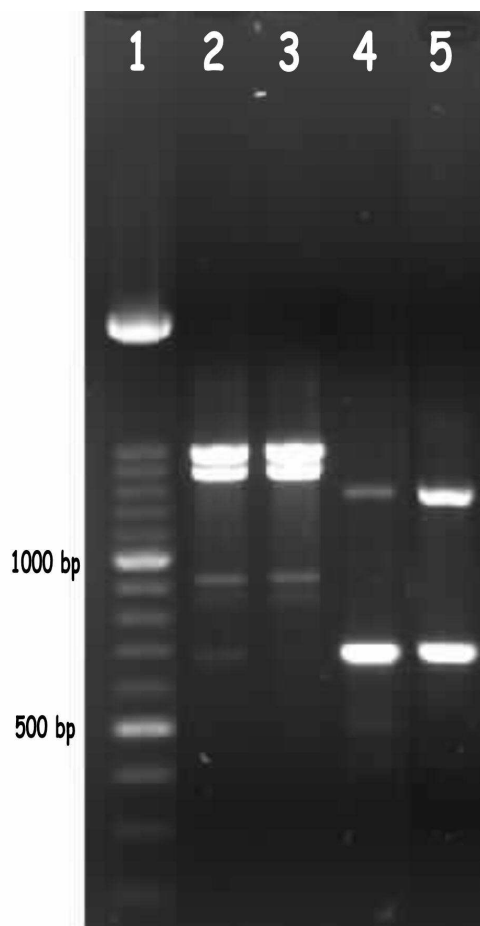
2 : BU-P04-C05 – Membre antérieur (type II)

3 : BU-P04-C06 – Diaphragme (superposition avec le profil du tissu)

4 : BU-P04-C07 – Cou (type II)

5 : BU-P04-T04 – Tissu (type TA03)

Figure 13 : Effet de l'état du cysticerque sur les profils obtenus par A07 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : PM 100 bp-ladder

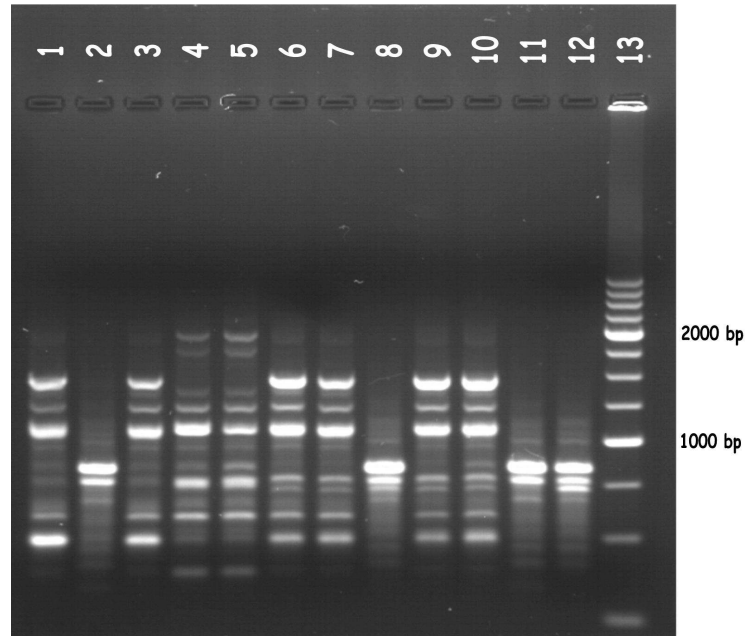
2 : MX-P15-C01 – Membre postérieur (type III)

3 : MX-P15-C02 – Membre antérieur (type III)

4 : MX-P15-C03 – Cerveau (Profil du tissu)

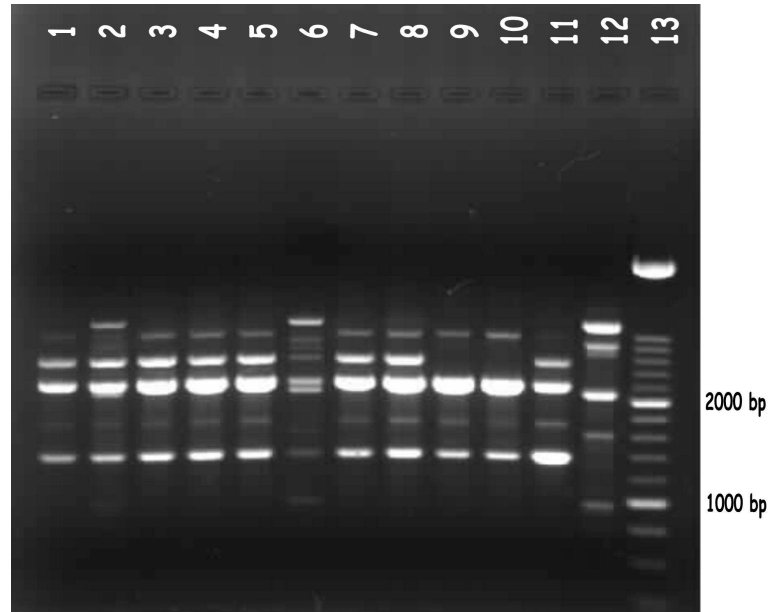
5 : MG-120-T01 – Tissu (type TA07)

Figure 14 : Effet de l'état du cysticerque sur les profils obtenus par A13 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : BU-P04-C05 – Membre antérieur (type II)
- 2 : BU-P04-C06 – Diaphragme (tissu, type TA13)
- 3 : BU-P04-C07 – Cou (type II)
- 4 : MADA (type I)
- 5 : MG-102-C03 – Poitrine (type I)
- 6 : MX-P15-C01 – Membre postérieur (type IV)
- 7 : MX-P15-C02 – Membre antérieur (type IV)
- 8 : MX-P15-C03 – Cerveau (profil du tissu)
- 9 : MX-P16-C01 – Membre postérieur (type IV)
- 10 : MX-P16-C02 – Membre antérieur (type IV)
- 11 : BU-P03-C02 – Cuisse (profil du tissu)
- 12 : MX-P15-T – Tissu (type TA13)
- 13 : PM 250 bp-ladder

Figure 15 : Effet de l'état du cysticerque sur les profils obtenus par B01 (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



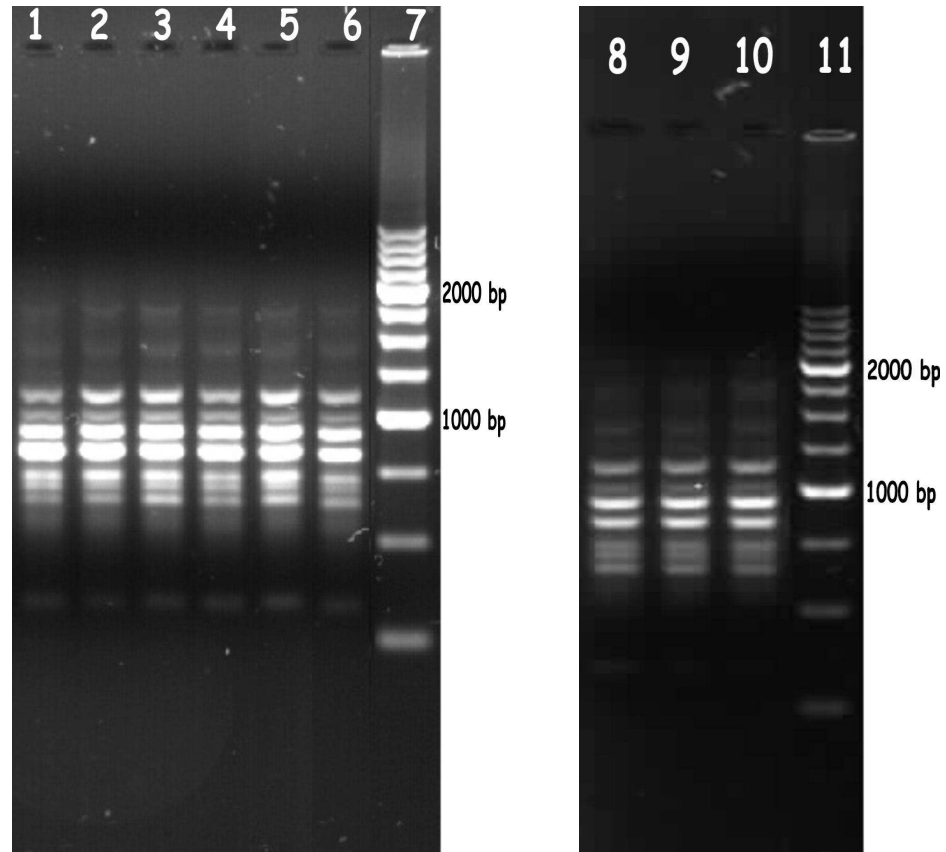
- 1 : BU-P04-C05 – Cuisse (type II)
- 2 : BU-P04-C06 – Diaphragme (superposition avec le profil du tissu)
- 3 : BU-P04-C07 – Cou (type II)
- 4 : MX-P15-C01 – Membre antérieur (type II)
- 5 : MX-P15-C02 – Membre postérieur (type II)
- 6 : MX-P15-C03 – Cerveau (superposition avec le profil du tissu)
- 7 : BU-P04-C02 – Cœur (type II)
- 8 : BU-P04-C04 – Masseter (type II)
- 9 : MADA (type I)
- 10 : MG-102-C03 – Poitrine (type I)
- 11 : MG-113-C01 – Langue (type II)
- 12 : MX-P15-T – Tissu (type TB01)
- 13 :PM 100 bp-ladder

3. 3. 3. 2. 5. – Relation avec la localisation anatomique

L'analyse de la relation avec la localisation anatomique ne concerne que les prélèvements porcins car chez l'homme, nous n'avons pu obtenir qu'un seul échantillon par individu.

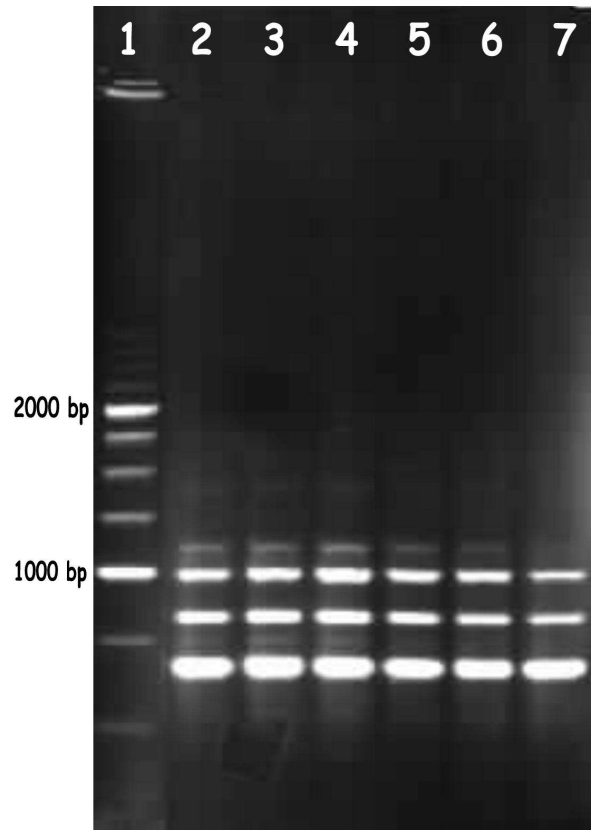
Nous n'avons pas pu trouver de différences de profil entre les cysticerques d'un même porc prélevés sur différentes localisations à l'exception des cysticerques provenant de trois porcs de l'état de Morelos (MX-P12, MX-P13 et MX-P14). Toutefois, les différences observées chez ces derniers ne peuvent pas être reliées à la localisation anatomique des cysticerques puisque les trois échantillons montrent des profils différents. Les figures 16, 17, 18, 19 et 20 montrent les profils obtenus par A02, A03, A07, A13 et B01 respectivement pour différentes localisations anatomiques.

Figure 16 : Profils obtenus par A02 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : Langue (BU-P04 – type II)
- 2 : Coeur (BU-P04 – type II)
- 3 : Cuisse (BU-P04 – type II)
- 4 : Masseter (BU-P04 – type II)
- 5 : Membre antérieur (BU-P04 – type II)
- 6 : Cou (BU-P04 – type II)
- 7 et 11 : PM 250 bp-ladder
- 8 : Membre antérieur (MX-P11 – type II)
- 9 : Membre postérieur (MX-P11 – type II)
- 10 : Cerveau (MX-P11 – type II)

Figure 17 : Profils obtenus par A03 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : PM 250 bp-ladder

2 : Membre postérieur droit (MX-P07 – type IV)

3 : Membre postérieur gauche (MX-P07 – type IV)

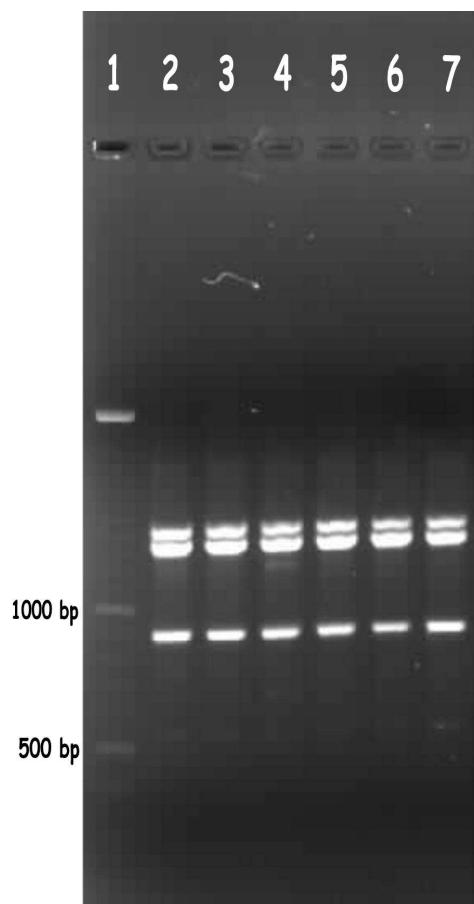
4 : Diaphragme (MX-P07 – type IV)

5 : Membre antérieur droit (MX-P07 – type IV)

6 : Membre antérieur gauche (MX-P07 – type IV)

7 : Cerveau (MX-P07 – type IV)

Figure 18 : Profils obtenus par A07 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



1 : PM 100 bp-ladder

2 : Membre postérieur droit (MX-P07 – type III)

3 : Membre postérieur gauche (MX-P07 – type III)

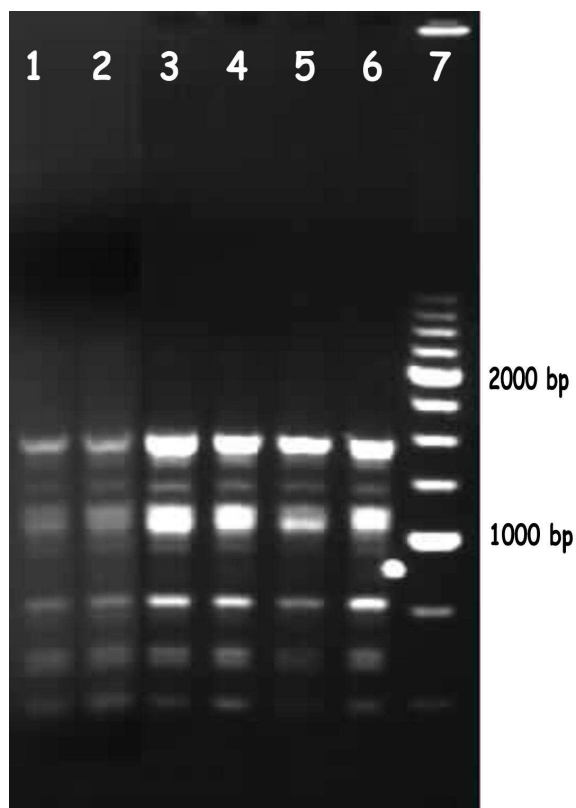
4 : Diaphragme (MX-P07 – type III)

5 : Membre antérieur droit (MX-P07 – type III)

6 : Membre antérieur gauche (MX-P07 – type III)

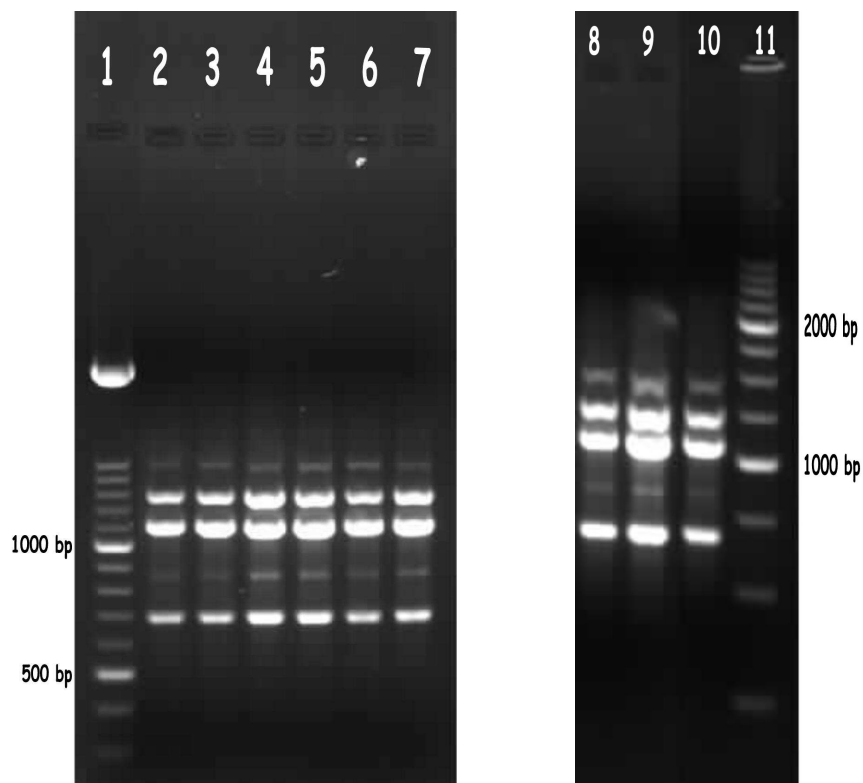
7 : Cerveau (MX-P07 – type III)

Figure 19 : Profils obtenus par A13 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : Membre antérieur gauche (MX-P07 – type IV)
- 2 : Cerveau (MX-P07 – type IV)
- 3 : Membre postérieur droit (MX-P07 – type IV)
- 4 : Membre postérieur gauche (MX-P07 – type IV)
- 5 : Diaphragme (MX-P07 – type IV)
- 6 : Membre antérieur droit (MX-P07 – type IV)
- 7 : PM 250 bp-ladder

Figure 20 : Profils obtenus par B01 pour les cysticerques prélevés sur différentes localisations anatomiques (interprétation du code des échantillons dans l'annexe 2)



- 1 : PM 250 bp-ladder
- 2 : Langue (BU-P04 – type II)
- 3 : Coeur (BU-P04 – type II)
- 4 : Cuisse (BU-P04 – type II)
- 5 : Masseter (BU-P04 – type II)
- 6 : Membre antérieur (BU-P04 – type II)
- 7 : Cou (BU-P04 – type II)
- 8 : Membre postérieur (MX-P11 – type II)
- 9 : Membre antérieur (MX-P11 – type II)
- 10 : Cerveau (MX-P11 – type II)
- 11 : PM 100 bp-ladder

Aussi pour les études de comparaison, nous n'avons considéré qu'une seule localisation par porc. La localisation choisie est celle pour laquelle on n'observe pas de contamination du tissu de l'hôte.

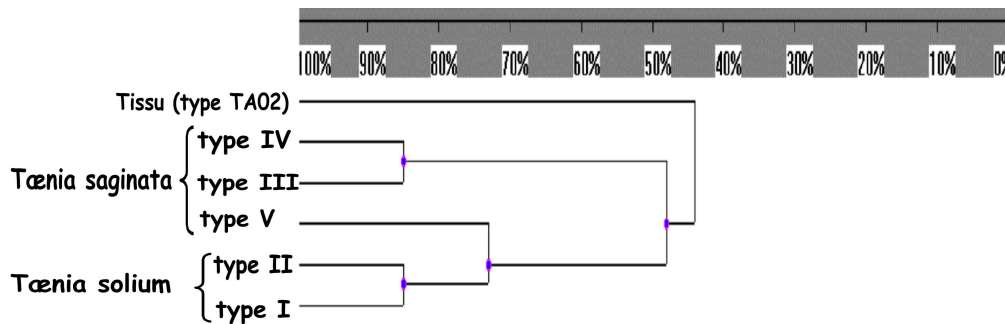
3. 3. 3. 2. 6. Comparaison des différents profils

Pour chaque amorce, les différents types de profils sont comparés en utilisant le logiciel Bio1D++ (Vilbert Lourmat, France).

Les figures 21 à 25 représentent les dendrogrammes obtenus pour les différentes amorces en tenant compte des coefficients d'homologie de Lei et Ni (Dice) avec un intervalle de confiance de 5%. Toutefois, on a obtenu des dendrogrammes similaires en considérant les coefficients d'homologie de Jaccard et 5% d'intervalle de confiance.

Figure 21 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l'amorce A02

	L1	L2	L3	L4	L5	L6
L1	1.00	0.57	0.50	0.25	0.50	0.40
L2		1.00	0.57	0.86	0.36	0.44
L3			1.00	0.75	0.67	0.80
L4				1.00	0.50	0.60
L5					1.00	0.86
L6						1.00

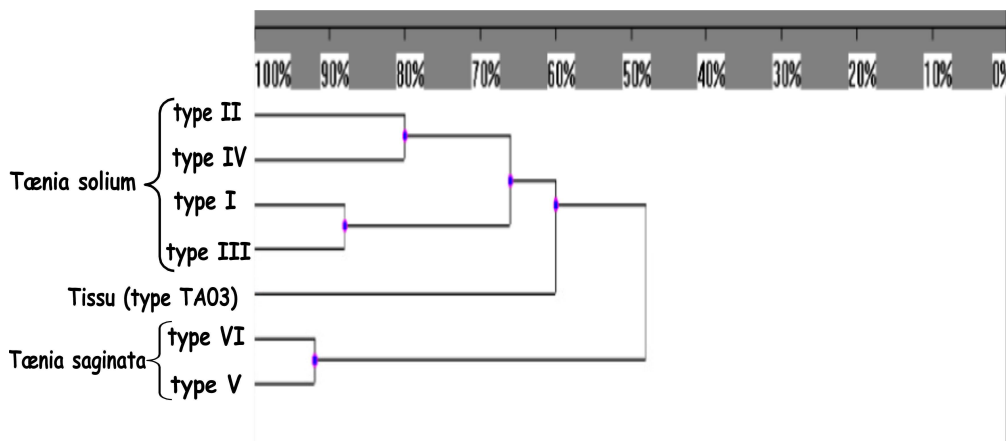


En haut, coefficients d'homologie (Nei et Li) obtenus avec un intervalle de confiance de 5%. L1 : Tissu (type TA02) ; L2 : *T. saginata* (type IV) ; L3 : *T. saginata* (type V) ; L4 : *T. saginata* (type III) ; L5 : MADA (type I) ; L6 : MX-P15 (type II) (pour l'interprétation du code des échantillons, cf. annexe 2).

En bas, dendrogramme déduit à partir des différents profils obtenus avec l'amorce A02. Le tissu ainsi que les types III et IV de *T. saginata* sont bien distincts des deux types de *T. solium* alors que le type V semble plus proche. Ils ont un coefficient d'homologie de 83%

Figure 22 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l'amorce A03

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7
L1	1.00	0.60	0.50	0.46	0.60	0.73	0.80
L2		1.00	0.60	0.36	0.50	0.67	0.75
L3			1.00	0.92	0.40	0.55	0.60
L4				1.00	0.36	0.50	0.55
L5					1.00	0.89	0.75
L6						1.00	0.89
L7							1.00

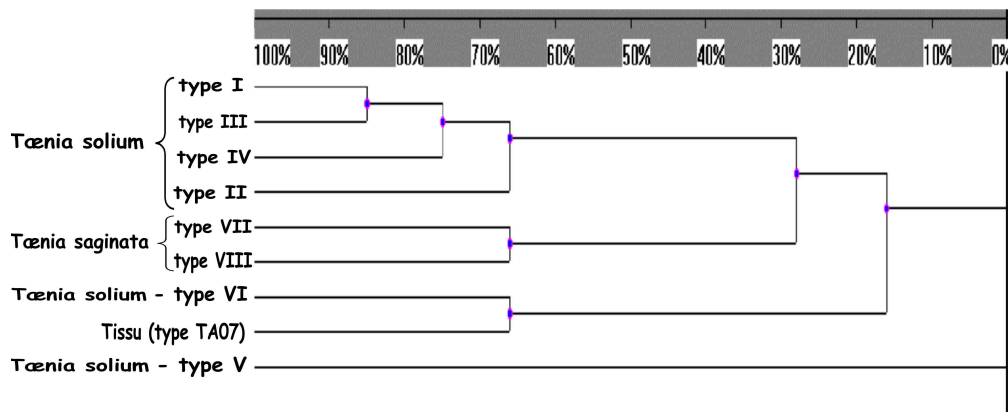


En haut, coefficients d'homologie (Nei et Li) obtenus avec un intervalle de confiance de 5%. L1 : BU-P04 (type II) ; L2 : Tissu (type TA03) ; L3 : *T. saginata* (type V) ; L4 : *T. saginata* (type VI) ; L5 : MADA (type I) ; L6 : CM-P03 (type III) ; L7 : MX-P16 (type IV) (pour l'interprétation du code des échantillons, cf. annexe 2).

En bas, dendrogramme déduit à partir des différents profils obtenus avec l'amorce A03. Les différents types de *T. solium* sont bien différenciés de ceux de *T. saginata* et du tissu. Ils se répartissent en deux groupes avec un coefficient d'homologie de 89% entre les types I et III et un coefficient d'homologie de 80% entre II et IV.

Figure 23 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l'amorce A07

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
L1	1.00	0.86	0.00	0.00	0.33	0.29	0.29	0.67	0.75
L2		1.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.50	0.86
L3			1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
L4				1.00	0.67	0.00	0.00	0.33	0.00
L5					1.00	0.40	0.40	0.57	0.00
L6						1.00	0.67	0.50	0.57
L7							1.00	0.50	0.29
L8								1.00	0.67
L9									1.00

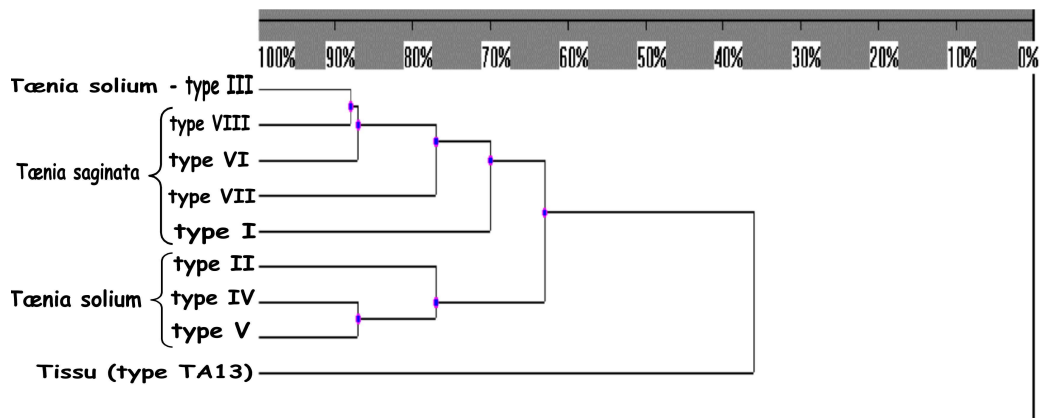


En haut, coefficients d'homologie (Nei et Li) obtenus avec un intervalle de confiance de 5%. L1 : MG-111 (type I) ; L2 : MX-P05 (type III) ; L3 : MX-P12 (type V) ; L4 : MX-P13 (type VI) ; L5 : Tissu (type TA07) ; L6 : *T. saginata* (type VII) ; L7 : *T. saginata* (type VIII) ; L8 : BU-P04 (type II) ; L9 : EC-P02 (type IV) (pour l'interprétation du code des échantillons, cf. annexe 2).

En bas, dendrogramme déduit à partir des différents profils obtenus avec l'amorce A07. Les types I à IV de *T. solium* sont bien différents de ceux de *T. saginata* et du tissu. Les profils de types I et III sont les plus proches avec un coefficient d'homologie de 86%. Les profils de types V (MX-P12) et VI (MX-P13) n'ont que peu de ressemblance avec les types I à IV. Ils sont toutefois bien distincts de ceux de *T. saginata*.

Figure 24 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l'amorce A13

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
L1	1.00	0.57	0.63	0.36	0.88	0.78	0.89	0.71	0.78
L2		1.00	0.83	0.00	0.67	0.57	0.71	0.62	0.71
L3			1.00	0.22	0.71	0.63	0.75	0.67	0.88
L4				1.00	0.22	0.36	0.18	0.20	0.18
L5					1.00	0.75	0.88	0.53	0.75
L6						1.00	0.78	0.59	0.67
L7							1.00	0.59	0.89
L8								1.00	0.71
L9									1.00

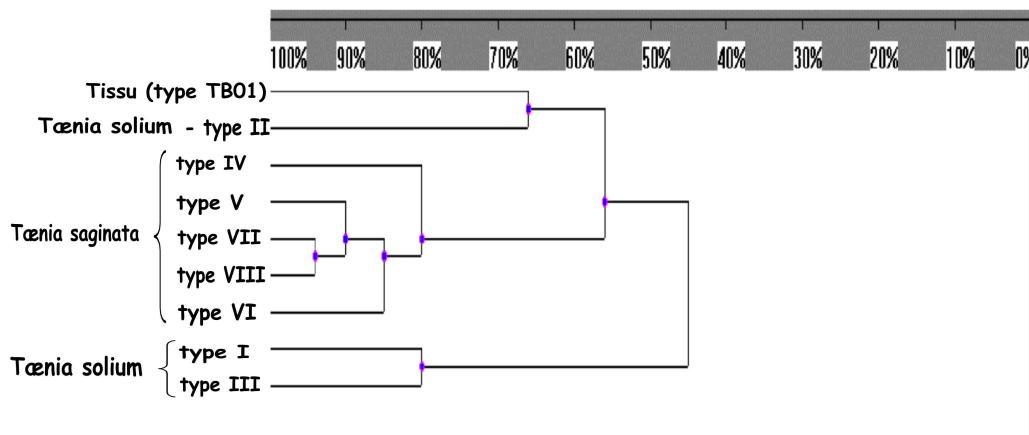


En haut, coefficients d'homologie (Nei et Li) obtenus avec un intervalle de confiance de 5%. L1 : CM-P05 (type III) ; L2 : BU-P04 (type II) ; L3 : MX-P15 (type IV) ; L4 : Tissu (type TA13) ; L5 : *T. saginata* (type VI) ; L6 : *T. saginata* (type VII) ; L7 : *T. saginata* (type VIII) ; L8 : MADA (type I) ; L9 : EC-P02 (type V) (pour l'interprétation du code des échantillons, cf. annexe 2).

En bas, dendrogramme déduit à partir des différents profils obtenus avec l'amorce A13. Les types I, II, IV et V sont bien distincts des ceux de *T. saginata* et du tissu. Les types II, IV et V forment un groupe avec une homologie supérieure à 70%. Alors que le type III est regroupé avec ceux de *T. saginata*.

Figure 25 : Comparaison des différents types de profils obtenus par l'amorce B01

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
L1	1.00	0.67	0.25	0.67	0.55	0.62	0.62	0.53	0.57
L2		1.00	0.80	0.67	0.50	0.40	0.40	0.33	0.36
L3			1.00	0.80	0.29	0.22	0.22	0.18	0.20
L4				1.00	0.25	0.20	0.20	0.17	0.18
L5					1.00	0.83	0.83	0.71	0.77
L6						1.00	0.86	0.88	0.93
L7							1.00	0.88	0.93
L8								1.00	0.94
L9									1.00



En haut, coefficients d'homologie (Nei et Li) obtenus avec un intervalle de confiance de 5%. L1 : Tissu (type TB01) ; L2 : MG-115 (type I) ; L3 : CM-P02 (type III) ; L4 : BU-P04 (type II) ; L5 : *T. saginata* (type IV) ; L6 : *T. saginata* (type V) ; L7 : *T. saginata* (type VI) ; L8 : *T. saginata* (type VII) ; L9 : *T. saginata* (type VIII) (pour l'interprétation du code des échantillons, cf. annexe 2).

En bas, dendrogramme déduit à partir des différents profils obtenus avec l'amorce B01. Les types I et III sont proches (coefficient d'homologie de 80%) et se distinguent bien des *T. saginata* et du tissu. En revanche, ils sont très éloignés du type II. Les différents échantillons de *T. saginata* se regroupent avec un coefficient d'homologie supérieur à 70%.

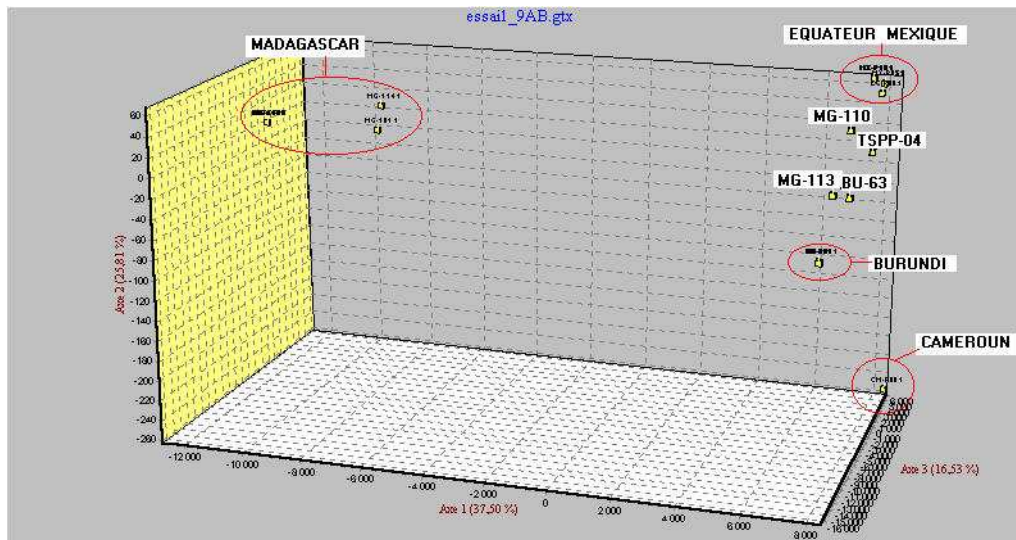
3. 3. 3. 2. 7. Analyse factorielle des correspondances

Une analyse factorielle des correspondances a été effectuée en considérant l'ensemble des données. Cette analyse été réalisée en utilisant le logiciel Genetix[®]. Dans cette analyse, les échantillons de profils atypiques (MX-P12, MX-P13 et MX-P14) ainsi que les échantillons donnant des profils identiques à celui du tissu (BU-93, BU-105, BU-110, BU-114, BU-117 et BU-175) ont été exclus.

La figure 26 montre la représentation graphique de cette analyse de correspondance avec les échantillons de *T. solium*.

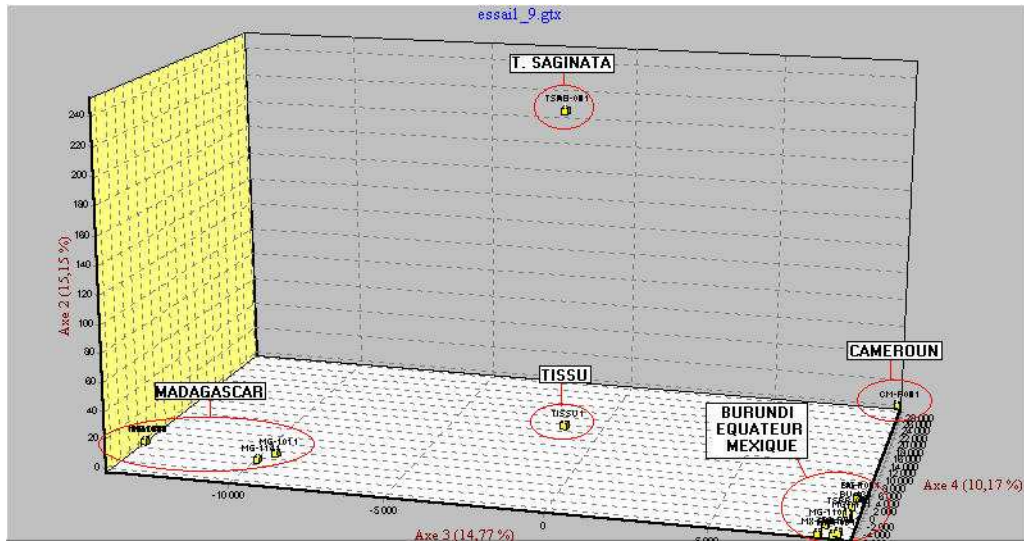
La figure 27 montre le résultat obtenu en considérant les échantillons de *T. solium*, de *T. saginata* et les tissus.

Figure 26 : Représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances des échantillons de *Tænia solium*.



Globalement, on peut dire que les parasites provenant de l'Equateur, du Mexique, du Burundi et du Cameroun forment un groupe. Les parasites de Madagascar, à l'exception de MG-106, MG-110 et MG-113, forment un autre groupe. Le premier groupe peut être subdivisé en 3 sous-groupes : Equateur-Mexique, Burundi, et Cameroun (MG-110, MG-113, BU-63 et TSP-04 constituent des formes intermédiaires entre Equateur-Mexique et Burundi).

Figure 27 : Représentation graphique de l'analyse factorielle des correspondances des échantillons de *Tænia solium* et *T. saginata*.



Les échantillons de *T. solium* sont bien distincts de ceux de *T. saginata* et des tissus de l'hôte.

3. 3. 4. – Interprétation et discussion

3. 3. 4. 1. – Choix des techniques

Nous avons choisi l'isoélectrofocalisation pour l'étude des isoenzymes car cette technique a montré qu'elle a un pouvoir de discrimination élevé pour différencier diverses souches de parasites allant des protozoaires tels que *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, ou encore *Leishmania*, aux helminthes comme *Trichinella*. Par ailleurs, elle est déjà utilisée dans notre laboratoire pour l'étude de la diversité de *Toxoplasma gondii* (Dardé *et al.*, 1992).

Quant à la technique RAPD, notre choix a été dicté par le fait qu'aujourd'hui, la connaissance du génome de *T. solium* est très succincte. La RAPD est une technique rapide, simple à mettre en œuvre et permet d'analyser tout le génome de l'organisme à étudier. Le problème de reproductibilité observée avec la RAPD est essentiellement dû à la faible température d'hybridation des amorces utilisées. Lors de l'hybridation des amorces au segment d'ADN à amplifier, une faible température favorise les reconnaissances non spécifiques. Toutefois, nous avons vu que pour les amorces qui ont permis de montrer des différences, seules les bandes de faible intensité ne sont pas reproductibles. En excluant ces bandes dans l'analyse des résultats, la RAPD peut se révéler être une technique très fiable.

3. 3. 4. 2. – Conservation des échantillons

Pour pouvoir collecter le maximum d'échantillons, nous avons choisi de conserver les échantillons dans de l'éthanol à 70%. Cette méthode de conservation permet de garder les échantillons à +4°C ou à température ambiante facilitant ainsi le transport des échantillons car dans la plupart des pays d'endémie, il est très difficile d'avoir de l'azote liquide ou de la carboglace pour préserver les échantillons des différences de températures pouvant survenir

au cours du transport. Toutefois, cette conservation n'est pas l'idéal car au cours du temps, l'ADN se dégrade. Ceci est observé par la diminution de la quantité d'ADN récupérée après une extraction et par l'obtention de trainée lors de la quantification de l'ADN extrait. Il est donc conseillé de congeler les échantillons dès leur arrivée à destination pour éviter de les perdre.

Ceci expliquerait alors le fait que nous n'avons pas pu obtenir d'ADN à partir des échantillons du Togo. En effet, ces échantillons ont été conservés depuis plusieurs années. Pour l'extraction, le formol n'agit que sur l'activité de la protéinase K en l'inhibant. Toutefois, après un rinçage soigneux des échantillons, le formol est éliminé et la protéinase K retrouve toute son activité.

3. 3. 4. 3. – Isoenzymes

Dans la littérature, très peu d'études rapportent l'utilisation des isoenzymes pour détecter les diversités inter- ou intraspécifiques chez les *Taenia*. L'étude réalisée par Le Riche & Sewell (1978) a été parmi les premières. Dans cette étude, les auteurs ont rapporté que *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *Taenia multiceps*, *Taenia ovis*, *Taenia pisiformis*, *Taenia saginata*, *Taenia solium*, et *Taenia taeniaeformis* peuvent être différenciés par l'adénylate kinase (AK, E. C. 2. 7. 4. 3), la glucose déshydrogénase-NAD dépendante (GDH, E. C. 1. 4. 1. 2), la glucose phosphate isomérase (GPI, E. C. 5. 3. 1. 9), la malate déshydrogénase-NAD dépendante (MDH, E. C. 1. 1. 1. 37) et l'hexokinase (HK, E. C. 2. 7. 1. 1). En 1995, Okamoto *et al.* ont trouvé des variations intraspécifiques au sein de *Taenia taeniaeformis* en utilisant l'adénosine désaminase (ADA, E. C. 3. 5. 4. 4), l'énolase (ENO, E. C. 4. 2. 1. 11), la glucose phosphate isomérase (GPI, E. C. 2. 6. 1. 2), la glutamate pyruvate transaminase (GPT, E. C. 2. 6. 1. 2), l'hexokinase (HK, E. C. 2. 7. 1. 1), la peptidase B (PEP B, E. C. 3. 4. 11. 1), la 6-phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD, E. C. 1. 1. 1. 44) et la phosphoglucomutase (PGM, E. C. 1. 15. 1. 1). Dans notre étude, nous avons observé qu'avec l'adénylate kinase l'échantillon provenant du Togo a un profil de bandes différent de celui observé pour les échantillons provenant du Mexique et de Madagascar. Comme nous n'avons

pu analyser qu'un petit nombre d'échantillons, il nous est difficile de dire si cette différence est liée à une répartition géographique. Toutefois, cette technique nous a permis de montrer que des différences intraspécifiques existent au sein de l'espèce *T. solium* et que cette diversité peut être révélée par une étude isoenzymatique.

3. 3. 4. 4. – RAPD

3. 3. 4. 4. 1. – Diversité et localisation anatomique

Dans notre étude, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'existence d'une diversité entre les différents échantillons prélevés dans diverses localisations anatomiques. Apparemment, la répartition des cysticerques dans les tissus et les organes de l'hôte est le fruit du hasard.

Il est probable que les échantillons que nous avons analysés proviennent d'une même source c'est-à-dire que les œufs à l'origine de l'infection ont été émis par la même personne. Comme *T. solium* est hermaphrodite, l'auto-fécondation est fréquente. Et l'apport de nouveaux matériels génétiques est plus faible que dans le cas où il y a une « fécondation externe ».

Nous ne pouvons pas pour autant conclure que cette diversité n'existe pas. Seulement, les différentes amorces que nous avons choisies d'utiliser dans notre étude n'ont pas pu la mettre en évidence. Avec d'autres primers, il est possible qu'une différence puisse être mise en évidence.

Par ailleurs, nous avons supposé qu'une bande représente un « locus ». Or, nous ne pouvons pas affirmer que deux bandes de taille identique proviennent d'un même segment d'ADN. Pour cela, il aurait fallu faire un séquençage des produits d'amplification de l'ADN et comparer les séquences.

3. 3. 4. 4. 2. –Comparaison des profils

◆ Amorces A02 : les deux types de profil de *T. solium* forment deux groupes distincts bien que proches (coefficient d'homologie supérieur à 80%). Toutefois, l'utilisation de l'amorce A02 uniquement ne permet pas de différencier avec certitude les deux espèces (*T. solium* et *T. saginata*) puisque le type V (*T. saginata*) est plus proche des types I et II (*T. solium*).

◆ Amorces A03 : on observe que les 4 types de profil obtenus avec *T. solium* se regroupent deux à deux. Les échantillons de type II (Burundi, MG-106, MG-110 et MG-113) et de type IV (Mexique et Equateur) d'une part avec un coefficient d'homologie de 80% et les échantillons de type I (Madagascar) et de type III (Cameroun) d'autre part avec un coefficient d'homologie de 89%. L'amorce A03 permet de différencier les deux espèces puisque les quatre types de profil obtenus avec *T. solium* sont bien distincts des profils obtenus avec les échantillons de *T. saginata*.

◆ Amorces A07 : Pour *T. solium*, les types I à IV sont liés avec une forte relation entre les types I (Madagascar, Burundi, Cameroun) et III (Mexique), alors que les profils type V (MX-P12) et type VI (MX-P13) en sont très éloignés. Globalement, les deux espèces (*T. solium* et *T. saginata*) sont bien distinguées avec l'amorce A07.

◆ L'amorce A13 est la seule amorce qui nous permette de distinguer les différents échantillons en fonction de leur origine géographique. Si les échantillons provenant du Mexique (type IV) et ceux provenant d'Equateur (type V) sont très proches avec un coefficient d'homologie de 95%, ils sont plus éloignés de ceux provenant de Cameroun (type III) et encore plus de ceux provenant de Madagascar (type I) et du Burundi (type II). En revanche, elle ne sépare pas bien les échantillons de *T. solium* de ceux de *T. saginata*.

◆ Pour l'amorce B01, les types I (Madagascar) et III (Cameroun) de *T. solium* sont proches (coefficient d'homologie de 86%). Alors que le type II (Burundi, Mexique et

Equateur) est bien séparé des deux précédents. Les cinq types de *T. saginata* forment un groupe avec des coefficients d'homologie supérieurs à 80% et bien distincts de profils obtenus avec les échantillons de *T. solium*.

Sur les 11 cysticerques isolés chez l'homme (7 provenant du Burundi et 4 du Togo), seul un cysticerque (BU-63) a donné des résultats interprétables. Les 6 autres cysticerques provenant du Burundi ont généré un profil identique à celui du tissu quelle que soit l'amorce utilisée. Pour les 4 cysticerques du Togo, il n'a pas été possible d'obtenir de l'ADN. Quelle que soit l'amorce, nous n'avons pas trouvé de différence entre les profils obtenus avec les cysticerques isolés chez le porc et BU-63 (profil identique à l'un des profils obtenus avec les cysticerques isolés chez le porc).

Nous avons observé trois échantillons dont les profils sont atypiques. Pour ces trois échantillons, les différences observées ne peuvent pas être reliées à un critère de localisation anatomique ou de répartition géographique. Comme il n'y a pas de certitude que l'immunisation acquise lors d'une infection antérieure protège de façon permanente contre une nouvelle infection, les cysticerques analysés pourraient provenir d'une infection multiple provenant de plusieurs sources de contamination.

Quelle que soit l'amorce considérée, les deux espèces de *Tænia* montrent des profils différents. Par ailleurs, les profils obtenus avec les échantillons prélevés sur l'hôte sont bien distincts des profils obtenus avec les deux espèces. Cette technique permet donc de mettre en évidence les diversités intraspécifiques et les diversités interspécifiques.

3. 3. 4. 4. 3. – Diversité et répartition géographique

L'analyse factorielle des correspondances montre que les souches mexicaines et équatoriennes sont les plus proches. On peut supposer donc qu'elles proviennent d'une même origine et que les différences observées sont l'expression d'une évolution propre à chaque souche dans un environnement donné. Les souches provenant d'Afrique sont beaucoup plus

éloignées de celles d'Amérique Latine, en particulier celles provenant de Madagascar à l'exception de trois souches (MG-106, MG-110 et MG-113).

En travaillant sur l'ADN mitochondrial de *T. solium*, Ito *et al.* (2003) ont rapporté que les souches d'Amérique Latine et d'Afrique proviennent d'une même origine : génotype européen qui est bien distinct du génotype asiatique qui a évolué indépendamment en Asie. En se basant sur des données historiques de la domestication du porc et d'une étude d'évolution moléculaire, ces auteurs supposent que l'Afrique et l'Amérique Latine ont été contaminés par *T. solium* lors de la période de la colonisation.

Si on adhère à cette hypothèse, les différences observées dans notre étude entre diverses zones géographiques seraient alors dues à une adaptation du parasite à son environnement. Les souches américaines sont plus proches car leurs environnements sont similaires. Pour les souches africaines, les différences sont plus prononcées.

Le cas de Madagascar est intéressant de part son histoire et ses origines. Nous avons trouvé que les souches de Madagascar sont très éloignées de celles d'Amérique et d'Afrique. Ceci rejoint un peu les résultats obtenus par les équipes japonaises. En effet, la population malgache a des origines à la fois asiatiques (en particulier, indonésienne et malaisienne) et africaines. D'après l'histoire malgache, ce sont les pêcheurs indonésiens et malaisiens qui sont les premiers à s'installer à Madagascar. Ceux-ci ont migré vers l'intérieur des terres et ont colonisé le haut plateau. Les africains sont venus plus tard et se sont installés sur la côte. Lors de leur migration, ces gens auraient apporté avec eux des spécimens de *T. solium* qui ont évolué dans l'île.

Dans cette étude, les échantillons que nous avons analysés proviennent tous de la région du haut plateau de Madagascar (Provinces d'Antananarivo et de Fianarantsoa), qui est constituée majoritairement de personnes d'origine asiatique. Les échantillons de *T. solium* de Madagascar, à l'exception des trois souches citées plus haut, pourraient donc être de génotype asiatique. Malheureusement, nous ne disposons pas de spécimens d'origine asiatique qui nous auraient permis d'étayer cette hypothèse.

3. 4. – Notes sur les techniques utilisées à Limoges et au Mexique

Des amorces différentes et des protocoles d'analyse différents ont été utilisés à Limoges et au Mexique car pour réduire le risque de contamination, il a été décidé d'utiliser au Mexique des kits de RAPD (Amersham Biosciences). Contrairement à Limoges, le laboratoire au Mexique ne dispose pas de salle réservée pour la préparation du MIX. L'utilisation des kits réduit le nombre d'étapes nécessaires à la préparation des échantillons à amplifier. Les amorces A01, A02, A03, A04, A05, et A06 utilisés au Mexique sont fournies avec le kit. Le protocole utilisé correspond au protocole recommandé par le fabricant. Il est à noter que les amorces A01 à A06 ne sont pas les mêmes que les amorces de même nom utilisées à Limoges. Outre ces six amorces, trois autres amorces OPA-03, OPA-07 et OPA-13 sont utilisées. Ces amorces supplémentaires correspondent respectivement aux amorces A03, A07 et A13 utilisées à Limoges.

Les profils obtenus avec les amorces OPA-03, OPA-07 et OPA-13 sont différents de ceux obtenus avec les amorces A03, A07 et A13 respectivement. Une des limites de la technique RAPD réside dans le fait que toute variation dans le protocole entraîne un changement du profil généré. Toutefois, en ne considérant que le résultat global, les deux études aboutissent à des conclusions comparables à savoir qu'aucune différence n'a été observée entre les différentes localisations anatomiques ; les échantillons provenant de Madagascar et ceux provenant du Mexique forment deux groupes assez éloignés génétiquement.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les prévalences de la cysticercose rapportées dans les différents pays d'Afrique montraient une grande variation. Cette variation peut être due aussi bien aux biais introduits dans la méthodologie étant donné que la plupart des études effectuées en Afrique sont des études basées sur la population hospitalière, que de la méthode biologique utilisée pour mesurer l'exposition. L'étude réalisée à Madagascar montre que l'origine géographique des cysticerques utilisés pour la préparation de la solution d'antigène pourrait influencer sur la détection des anticorps dirigés contre *C. cellulosae*. Ceci nous a amené à étudier une biodiversité possible chez *T. solium*.

Bien que nous n'ayons pu analyser qu'un très petit nombre d'échantillons par la technique d'isoélectrofocalisation, nous avons pu voir que les isoenzymes peuvent être utilisées pour détecter des variations intraspécifiques. Elles sont déjà très utiles pour les variations interspécifiques.

Par la technique RAPD, nous n'avons pas trouvé de variations entre les différents échantillons de *T. solium* prélevés sur le même individu. Etant donné que *T. solium* est hermaphrodite, la fréquence de l'auto-fécondation est élevée. Or, l'auto-fécondation ne favorise pas l'échange de matériel génétique, et par conséquent, la diversité.

Dans l'étude réalisée à Limoges, nous n'avons pas trouvé de différence entre les échantillons provenant de régions différentes d'un même pays alors que l'étude effectuée au Mexique a montré une faible différence entre les cysticerques provenant de la région du Mexique Centre et ceux provenant du Mexique du Sud Est. En ne considérant pas les bandes de faible intensité dans l'analyse réalisée à Limoges, nous avons diminué le pouvoir discriminatif de la RAPD. Toutefois, nous avons choisi de procéder ainsi car la technique RAPD est très sensible aux variations, même infimes, des différents paramètres de la

réaction ; or, les concentrations des solutions d'ADN que nous avons utilisées pour l'étude effectuée à Limoges sont des valeurs approximatives puisqu'elles ont été évaluées visuellement par rapport à une gamme étalon. Une variation de concentration entre les différents échantillons expliquerait en partie la difficulté d'obtenir des bandes de faible intensité reproductibles.

En revanche, les études réalisées au Mexique et à Limoges n'ont pas montré de différence entre les échantillons provenant des deux régions de Madagascar (Antananarivo et Fianarantsoa). Cette absence de différence est-elle la conséquence d'un flux de migration soutenu entre les deux régions étant donné que ces deux régions sont géographiquement proches ? Par ailleurs, elles sont composées en majorité de population ayant des origines asiatiques. Ou bien, nous n'avons pas trouvé de différence entre ces deux régions parce que nous n'avons pas analysé suffisamment d'échantillons pour permettre la mise en évidence d'une variation.

Par ailleurs, une absence de différence de profil ne signifie pas qu'il n'y ait pas de diversité. En effet, avec la RAPD, seuls les polymorphismes engendrant une différence de tailles des produits amplifiés sont détectables. Deux bandes de même taille peuvent avoir des compositions différentes. Pour se rendre compte vraiment de l'amplitude du polymorphisme, il serait intéressant de faire un séquençage des bandes amplifiées. Ceci peut être aussi réalisé sur les produits d'amplification d'amorces n'ayant pas montré de variabilité.

Dans l'étude réalisée au Mexique, un flux génétique faible a été trouvé entre Madagascar et le Mexique. La grande distance géographique entre ces deux pays fait que la probabilité de migration des porteurs de ténia humain est faible ; de même, le commerce de porcs. En revanche, un flux génétique élevé et une faible différence génétique ont été trouvés entre les trois localités du Mexique Centre. Leur proximité géographique favorise la migration de population et un commerce actif de porc entraînant un mélange de matériel génétique.

Que ce soit dans l'étude réalisée au Mexique ou dans celle effectuée à Limoges, nous avons observé une différence génétique entre les échantillons provenant de différents pays. Les échantillons de Madagascar se révèlent être très éloignés de ceux d'Amérique et

d'Afrique. Dans des études sur l'ADN mitochondrial de *T. solium* effectuées par Ito *et al.* (2003), les auteurs ont rapporté qu'il existe deux génotypes de cysticerques : le génotype européen et le génotype asiatique. Ils ont aussi rapporté que les parasites provenant d'Amérique et d'Afrique proviendraient du génotype européen, et que l'Afrique et l'Amérique Latine auraient été contaminées pendant la période de la colonisation. Est-ce que les cysticerques provenant de Madagascar sont proches du génotype asiatique ? Il nous faudrait analyser des cysticerques d'origine asiatique pour vérifier cette hypothèse.

Bibliographie

ADJIDÉ C. C., BOUTEILLE B., JOSSE R., et al. – Séroprévalence de la cysticercose dans la commune lacustre de Vekky, département de l'Atlantique (Bénin). – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1996, 89, p. 24-29.

AGAPEJEV S. – Neurocysticercosis in Brazil : Epidemiological aspects. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Tenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 101-110.

AGATSUMA T., KETUDAT P., THAITHONG S., et al. – Electrophoretic analysis of a natural population of the Thai *Paragonimus heterotremus* and its genetic relationship to the three Japanese species *P. miyazakii*, *P. ohirai*, and *P. westermani*. – Parasitology Research, 1992, 78, p. 463-468.

ALLAN J. C., GARCIA-DOMINGUEZ C., CRAIG P. S., et al. – Sexual development of *Tenia solium* in hamsters. – Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1991, 85, p. 573-576.

ALLAN J.C., VELASQUEZ-TOHOM M., TORRES-ALVAREZ R., et al. – Field trial of the coproantigen-based diagnosis of *Tenia solium* taeniasis by enzyme-linked immunosorbent assay. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 54, p. 352-356.

ALLSOPP B. A., JONES A., ALLSOPP M. T. E. P., et al. – Interspecific characterization of several taeniid cestodes by isoenzyme analysis using isoelectric focusing in agarose. – Parasitology, 1987, 95, p. 593-601.

ANDRESEN K., IBRAHIM M. E., THEANDER T. G., et al. – Random amplified polymorphic DNA for the differentiation of *Leishmania donovani* isolates from Sudan. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 90, p. 204-205.

ANDREWS J. R. H., BANDI C., POZIO E., et al. – Identification of *Trichinella pseudospiralis* from a human case using random amplified polymorphic DNA. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53, p. 185-188.

ANDRIAMIANDRA A., CROS J., DODIN A., et al. – La cysticerose à Madagascar. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1969, p. 894-900.

ANDRIANJAFY. – Cysticerose humaine. – Bulletin des Sciences Médicales de Madagascar, 1910, 2, p. 53-60.

ANDRIANTSIMAHAVANDY A., LESBORDES J. L., RASOAHARIMALALA B., et al. – Neurocysticercosis : a major aetiological factor of late-onset epilepsy in Madagascar. – Tropical Medicine and International Health, 1997, 2, p. 741-746.

AUBRY P., NDAYIARAGIJE A., KAMAMFU G., et al. – A propos de deux cas de cysticerose au Burundi. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1990, 83, p. 288-289.

AUZEMERY A., ANDRIANTSIMAHAVANDY A., BERNARDIN P., et al. – La cysticerose intravitréenne. Evolution spontanée. A propos d'un cas. – Journal Français d'Ophtalmologie, 1996, 19, p. 556-558.

AUZEMERY A., ANDRIANTSIMAHAVANDY A., ESTERRE P., et al. – La cysticerose oculaire. – Médecine Tropicale, 1995, 55, 4 bis, p. 429-433.

AVODÉ D. G., BOUTEILLE B., AVIMADJE M., et al. – Epilepsie, hypertension intracrânienne, syndrome confusionnel et cysticerose cutanée. A propos d'un cas observé en milieu hospitalier au Bénin. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1994, 87, p. 186-188.

BANDI C., LA ROSA G., COMINCINI S., et al. – Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. – Parasitology, 1993, 107, p. 419-424.

BARRAL V., THIS P., IMBERT-ESTABLET D., et al. – Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. – Molecular and Biochemical Parasitology, 1993, 59, p. 211-222.

BELKHIR K., BORSA P., CHIKHI L., RAUFASTE N., BONHOMME F. – 1996-2002 GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. – Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

BOWDITCH B. M., ALBRIGHT D. G., WILLIAMS J. G. K., et al. – Use of randomly amplified polymorphic DNA markers in comparative genome studies. In :Zimmer E. A., White T. J., Cann R. L., Wilson A. C. Eds. Molecular evolution : Producing the biochemical data. – San Diego : Academic Press, Inc., 1993, p. 294-309. – (Methods in Enzymology, vol. 224).

BOWLES J., McMANUS D. P. – Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 50, p. 33-44.

BRANDT J. R. A., GEERTS S., DE DEKEN R., et al. – A monoclonal antibody-based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. – International Journal for Parasitology, 1992, 22, p. 471-477.

C. D. C. – Locally acquired neurocysticercosis – North Carolina, Massachusetts, and South Carolina, 1989-1991. – Morbidity and Mortality Weekly Report, 1992, 41, p. 1-4.

CAMPBELL G. D., FARRELL V. J. R. – Brain scans, epilepsy and cerebral cysticercosis. – South African Medical Journal, 1987, 72, p. 885-886.

CANTO-LARA S. B., CARDENAS-MARUFFO M. F., VARGAS-GONZALEZ A., et al. – Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolated from human cases with localized

cutaneous leishmaniasis from the state of Campeche, Yucatan peninsula, Mexico. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1998, 58, p. 444-447.

CAO W. C., VAN DER PLOEG C. P., GAO C. L., et al. – Seroprevalence and risk factors of human cysticercosis in a community of Shandong, China. – Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 1996, 27, p. 279-285.

CARPIO A., HAUSER W. A. – Neurocysticercosis and epilepsy. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 211-220.

CARRIQUE-MAS J., IHHOSHI N., WIDDOWSON M.-A., et al. – An epidemiological study of *Taenia solium* cysticercosis in a rural population in the Bolivian Chaco. – Acta Tropica, 2001, 80, p. 229-235.

CARYDAKIS C., BAULAC M., LAPLANE D., et al. – Cysticercose spinale pure. Note sur le liquide céphalo-rachidien. – Revue de Neurologie, 1984, 140, p. 590-593.

CHAMOUILLET H., BOUTEILLE B., ISAUTIER H., et al. – Séroprévalence de la cysticercose, teniasis et ladrerie porcine, à La Réunion en 1992. – Médecine Tropicale, 1997, 57, p. 41-46.

CHATEL G., GULLETTA M., SCOLARI C., et al. – Short report : Neurocysticercosis in an Italian traveler to Latin America. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1999, 60, p. 255-256.

COMMISSION ON EPIDEMIOLOGY AND PROGNOSIS, INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. – Guidelines for epidemiologic studies on epilepsy. – Epilepsia, 1993, 34, p. 592-596.

CORREA D., LACLETTE J. P., RODRIGUEZ-DEL-ROSAL E., et al. – Heterogeneity of *Taenia solium* cysticerci obtained from different naturally infected pigs. – Journal of Parasitology, 1987, 73, p. 443-445.

CORREA D., SANDOVAL M. A., HARRISON L. J. S., et al. – Human neurocysticercosis : comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1989, 83, p. 814-816.

COUTELLEC-VRETO M. A., GUILLER A., DAGUZAN J. – Allozyme variation in some populations of the freshwater snails *Lymnaea peregra*, *L. auricularia* and *L. stagnalis* (Gastropoda : Pulmonata). – Journal of Mollusc Study, 1994, 60, p. 393-403.

CRUZ M. E., CRUZ I., PREUX P.-M., et al. – Headache and cysticercosis in Ecuador, South America. – Headache, 1995, 35, p. 93-97.

CRUZ M. E., PREUX P.-M., DEBROCK C., et al. – Epidémiologie de la cysticercose cérébrale dans une communauté des Andes en Equateur. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1999, 92, p. 38-41.

CUETTER A. C., GARCIA-BOBADILLA J., GUERRA LUIS G., et al. – Neurocysticercosis : Focus on intraventricular disease. – Clinical Infectious Diseases, 1997, 24, p. 157-164.

DARDÉ M.L., BOUTEILLE B., PESTRE-ALEXANDRE M. – Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. – Journal of Parasitology, 1992, 78, p. 786-794.

DE GRAAF A. S., SHAUGHNESSY P. D., MCCULLY R. M., et al. – Occurrence of *Taenia solium* in a Cape fur seal (*Arctocephalus pusillus*). – Onderstepoort Journal of Veterinary Research, 1980, 47, p. 119-120.

DEL BRUTTO O. H. – Single parenchymal brain cysticercus in the acute encephalitic phase : definition of a distinct form of neurocysticercosis with a benign prognosis. – Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 1995, 58, p. 247-249.

DEL BRUTTO O. H., SOTELO J. – Neurocysticercosis : an update. – Reviews of Infectious Diseases, 1988, 10, p. 1075-1087.

DIAZ J. F., VERASTEGUI M., GILMAN R. H., et al. – Immunodiagnosis of human cysticercosis (*Taenia solium*): a field comparison of an antibody-Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), an antigen-ELISA, and an Enzyme-Linked Immuno-electrotransfer Blot (EITB) assay in Peru. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, 46, p. 610-615.

DIETEMANN J. L., GENTILE A., DOSCH J. C., et al. – Aspects radiologiques de la cysticercose cérébrale et rachidienne. A propos de 2 observations. – Journal de Radiologie, 1985, 66, p. 143-149.

DIWAN A. R., COKER-VANN M., BROWN P., et al. – Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibody to cysticerci of *Taenia solium*. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1982, 31, p. 364-369.

DRUET-CABANAC M., RAMANANKANDRASANA B., BISSER S., et al. – *Taenia solium* cysticercosis in Africa. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* cysticercosis : from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 129-137.

DUMAS J.L., VISY J.M., BELIN C., et al. – Parenchymal neurocysticercosis : follow-up and staging by MRI. – Neuroradiology, 1997, 39, p. 12-18.

DUMAS M., GRUNITZKY K., BELO M., et al. – Cysticercose et neurocysticercose : enquête épidémiologique dans le nord de Togo. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1990, 83, p. 263-274.

DUMAS M., N'DIAYE I. P., DAUMENS J. P., et al. – Cysticercose cérébrale (deux nouveaux cas sénégalais). – Bulletin de la Société de Médecine d'Afrique Noire de Langue Française, 1976, 21, p. 203-211.

EARNEST M. P., RELLER L. B., FILLEY C. M., et al. – Neurocysticercosis in the United States : 35 cases and a review. – Reviews of Infectious Diseases, 1987, 9, p. 961-979.

ERHART A., DORNY P., VAN DE NGUYEN, et al. – *Taenia solium* cysticercosis in a village in northern Viet Nam : seroprevalence study using an ELISA for detecting circulating antigen. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 2002, 96, p. 270-272.

ESCOBAR A., WEIDENHEIM K. M. – The pathology of neurocysticercosis. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 289-305.

EVANS C. A. W., GONZALEZ A. E., GILMAN R. H., et al. – Immunotherapy for porcine cysticercosis : implications for prevention of human disease. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1997, 56, p. 33-37.

FAN P. C. – Taiwan *taenia* and *tæniasis*. – Parasitology Today, 1988, 4, p. 86-88.

FLEURY A. – Neurocysticercose : Facteurs impliqués dans la modulation de la susceptibilité à l'infection et à la maladie. Thèse de doctorat d'université. – Limoges : Université de Limoges, 2002. – 204 p.

FLISSER A., CORREA D., EVANS C. A. W. – *Taenia solium* cysticercosis : new and revisited immunological aspects. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 15-24.

GALÁN-PUCHADES M. T., FUENTES M. V. – Neurocysticercosis, *Taenia asiatica* and Cheju Island in Korea. – Trends in Parasitology, 2001, 17, p. 469-470.

GANG-ZHI W., CUN-JIANG L., JIA-MEI M., et al. – Cysticercosis of the central nervous system. A clinical study of 1400 cases. – Chinese Medical Journal, 1988, 101, p. 493-500.

GARCIA H. H., GILMAN R. H., GONZALEZ A. E., et al. – Human and porcine *Taenia solium* infection in a village in the highlands of Cusco, Peru. – Acta Tropica, 1999, 73, p. 31-36.

GARCÍA H. H., GILMAN R., MARTINEZ M., et al. – Cysticercosis as a major cause of epilepsy in Peru. – Lancet, 1993, 341, p. 197-200.

GARCÍA H. H., HARRISON L. J. S., PARKHOUSE R. M. E., et al. – A specific antigen-detection ELISA for the diagnosis of human neurocysticercosis. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1998, 92, p. 411-414.

GARCIA H. H., EVANS C. A. W., NASH T. E., et al. – Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. – Clinical Microbiological Reviews, 2002a, 15, p. 747-756.

GARCÍA H. H., GILMAN R. H., GONZALEZ A. E., et al. – What we have learnt from epidemiological studies of *Taenia solium* cysticercosis in Peru ? In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002b, p. 75-81.

GARCIA-NOVAL J., ALLAN J. C., FLETES C., et al. – Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in two rural guatemalan communities. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 55, p. 282-289.

GARCIA-NOVAL J., SANCHEZ A. L., ALLAN J. C. – *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in Central America. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium*

Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 91-100.

GASCON J., CORACHAN M., RAMIREZ J. – A propos de 5 cas de cysticerose au Rwanda. – Médecine Tropicale, 1989, 49, p. 77-80.

GEERTS S., ZOLI A., WILLINGHAM L., et al. – *Tenia solium* cysticercosis in Africa : an under-recognised problem. In : Craig P. and Pawlowski Z. Eds. Cestode Zoonoses : Echinococcosis and Cysticercosis. – Amsterdam : IOS Press, 2002, p. 13-23.

GELFAND M. – Cysticercosis of the brain in the Africans of Rhodesia. – East African Medical Journal, 1948, 25, p. 110-112.

GIORDANO C., VEDRENNE H., DAGO-EKRIBI A., et al. – Cysticerose cérébrale à forme confusionnelle avec aspects périodiques à l'EEG, étude anatomo-clinique. – Médecine d'Afrique Noire, 1976, 23, p. 43-51.

GOMES M. A., MELO M. N., MACEDO A. M., et al. – RAPD in the analysis of isolates of *Entamoeba histolytica*. – Acta Tropica, 2000, 75, p. 71-77.

GOMES M. L., MACEDO A. M., PENA S. D. J., et al. – Genetic relationships between *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients in southern Brazil as revealed by RAPD and SSR-PCR analysis. – Acta Tropica, 1998, 69, p. 99-109.

GONZALES A. E., GARCIA H. H., GILMAN R. H., et al. – Effective, single-dose treatment of porcine cysticercosis with oxfendazole. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, 54, p. 391-394.

GONZALES A. E., GARCIA H. H., GILMAN R. H., et al. – Treatment of porcine cysticercosis with albendazole. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53, p. 571-574.

GONZÁLEZ L. M., MONTERO E., HARRISON L. J. S., et al. – Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. – Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38, p. 737-744.

GRILL J., RAKOTOMALALA W., ANDRIANTSIMAHAVANDY A., et al. – High prevalence of serological markers of cysticercosis among epileptic Malagasy children. – Annals of Tropical Paediatrics, 1996, 16, p. 185-191.

GRUNITZKY E., BALOGOU A. K., M'BELLA M., et al. – La cysticercose chez des malades neurologiques en milieu hospitalier à Lomé, Togo. – Annales de Médecine Interne, 1995, 146, p. 419-422.

HANCOCK K., BROUGHEL D. E., MOURA I. N. S., et al. – Sequence variation in the cytochrome oxidase 1, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. – International Journal for Parasitology, 2001, 31, p. 1601-1607.

HANSEN N. J. D., HAGELSKJÆR L. H., CHRISTENSEN T. – Neurocysticercosis : A short review and presentation of a Scandinavian case. – Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1992, 24, p. 255-262.

HARRIS H., HOPKINSON D. A. – Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics. – Amsterdam : North-Holland Publishing Company, Inc., 1976, 295 p.

HOUINATO D., RAMANANKANDRASANA B., ADJIDÉ C., et al. – Seroprevalence of cysticercosis in Bénin. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1998, 92, p. 621-624.

HUBERT K., ANDRIANTSIMAHAVANDY A., MICHAULT A., et al. – Serological diagnosis of human cysticercosis by use of recombinant antigens from *Taenia solium* cysticerci. – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1999, 6, p. 479-482.

HUERTA L., TERRAZAS L. I., SCIUTTO E., et al. – Immunologic mediation of gonadal effects on experimental murine cysticercosis caused by *Taenia crassiceps*. – Journal of Parasitology, 1992, 87, p. 471-476.

HUERTA M., DE ALUJA A. S., FRAGOSO G., et al. – Synthetic peptide vaccine against *Taenia solium* pig cysticercosis : successful vaccination in a controlled field trial in rural Mexico. – Vaccine, 2002, 20, p. 262-266.

IBRAHIM A. P., CONWAY D. J., HALL A., et al. – Enzyme polymorphisms in *Ascaris lumbricoides* in Bangladesh. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 88, p. 600-603.

INSTITUT D'ÉPIDÉMIOLOGIE NEUROLOGIQUE ET DE NEUROLOGIE TROPICALE, ASSOCIATION PANAFRICAINNE DES SCIENCES NEUROLOGIQUES. – Questionnaire d'investigation de l'épilepsie dans les pays tropicaux. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 2000, 93, 4 (supplément).

ISIDRO-LLORENS A., DACHS F., VIDAL J., et al. – Spinal cysticercosis. Case report and review. – Paraplegia, 1993, 31, p. 128-130.

ITO A., PUTRA M. I., SUBAHAR R., et al. – Dogs as alternative intermediate hosts of *Taenia solium* in Papua (Irian Jaya), Indonesia confirmed by highly specific ELISA and immunoblot using native and recombinant antigens and mitochondrial DNA analysis. – Journal of Helminthology, 2002a, 76, p. 311-314.

ITO A., NAKAYA K., SAKO Y., et al. – NOD-*scid* mouse as an experimental animal model for cysticercosis. – Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health, 2001, 32, Suppl. 2, p. 85-89.

ITO A., PLANCARTE A., MA L., et al. – Novel antigens for neurocysticercosis : simple method for preparation and evaluation for serodiagnosis. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1998, 59, p. 291-294.

ITO A. – Serologic and molecular diagnosis of zoonotic larval cestode infections. – Parasitology International, 2002b, 51, p. 221-235.

ITO A., YAMASAKI H., NAKAO M., ET AL. – Multiple genotypes of *Taenia solium* – ramifications for diagnosis, treatment and control. – Acta Tropica, 2003, 87, p. 95-101.

JAY M., PETITHORRY J. – La cysticerose cérébrale à l’Ile de La Réunion. – Médecine Tropicale, 1974, 34, p. 327-354.

JOBET E., BOUGNOUX M. E., MORAND S., et al. – Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for generating specific DNA probes for oxyuroid species (Nematoda). – Parasite, 1998, 5, p. 47-50.

KATAMURA K., YAMAUCHI T., FUDUI T., et al. – Prostaglandin E₂ at priming of naive CD4⁺ T cells inhibits acquisition of ability to produce IFN-gamma and IL-2, but not IL-4 and IL-5. – Journal of Immunology, 1995, 155, p. 4604-4612.

KRÁL’OVÁ I.A, ŠPAKULOVÁ M. – Intraspecific variability of *Proteocephalus exiguus* La Rue, 1911 (Cestoda: Proteocephalidae) as studied by the random amplified polymorphic DNA method. – Parasitology Research, 1996, 82, p. 542-545.

LANGAND J., BARRAL V., DELAY B., et al. – Detection of genetic diversity within snail intermediate hosts of the genus *Bulinus* by using random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs). – Acta Tropica, 1993, 55, p. 205-215.

LARRALDE C., LACLETTE J. P., OWEN C. S., et al. – Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and Hemagglutination tests. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1986, 35, p. 965-973.

LEHMANN P. F., LIN D., LASKER B. A. – Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. – Journal of Clinical Microbiology, 1992, 30, p. 3249-3254.

LEIGNEL V., HUMBERT J. F., ELARD L. – Study by ribosomal DNA ITS 2 sequencing and RAPD analysis on the systematics of four *Metastrongylus* species (Nematoda: Metastrongyloidea). – Journal of Parasitology, 1997, 83, p. 606-611.

LE RICHE P. D., SEWELL M. M. H. – Differentiation of taeniid cestodes by enzyme electrophoresis. – International Journal for Parasitology, 1978, p. 479-483.

LEGER J., BRUGUIER A., TEXIER P., et al. – Cysticercose cérébrale. A propos d'une observation traitée par praziquantel. – Archives Française de Pédiatrie, 1985, 42, p. 451-453.

LELO T., MELANGA M., NDOMA K., et al. – La cysticercose cérébrale à Kinshasa, à propos de deux observations. – African Journal of Neurological Sciences, 1992, 11, p. 36-37.

LEVAV M., MIRSKY A. F., CRUZ M. E., et al. – Neurocysticercosis and performance on neuropsychologic tests : a family study in Ecuador. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53, p. 552-557.

LIGHTOWLERS M. W., FLISSER A., GAUCI C. G., et al. – Vaccination against cysticercosis and hydatid disease. – Parasitology Today, 2000, 16, p. 191-196.

LIGHTOWLERS M. W. – Eradication of *Taenia solium* cysticercosis : a role for vaccination of pigs. – International Journal for Parasitology, 1999, 29, p. 811-817.

MALDONADO P., DANDELOT J.-B., WOLGA J., et al. – Prévalence de la cysticercose calcifiée à l'île de La Réunion. Etude corrélative à l'épilepsie chez 625 malades hospitalisés par la radiographie des parties molles. – Médecine et Maladies Infectieuses, 1985, 15, p. 393-395.

MARAVILLA P., AVILA G., CABRERA V., et al. – Comparative development of *Taenia solium* in experimental models. – Journal of Parasitology, 1998, 84, p. 882-886.

MARTY P., HERZOG U., MARTY-JAUSSAN I., et al. – Deux cas de cysticerose observés au Cameroun. – Médecine Tropicale, 1985, 45, p. 83-86.

MASON P., HOUSTON S. GWANZURA L. – Neurocysticercosis: experience with diagnosis by ELISA serology and computerized tomography in Zimbabwe. – Central African Journal of Medicine, 1992, 38, p. 149-154.

McMANUS D. P. – Characterisation of taeniid cestodes by DNA analysis. – Revue Scientifique et Technique de l'Office International de l'Épizootie, 1990, 9, p. 489-510.

MOLINARI J. L., MEZA R., SUÁREZ B., et al. – *Taenia solium* : immunity in hogs to the cysticercus. – Experimental Parasitology, 1983, 55, p. 340-357.

MOLINARI J. L., RODRIGUEZ D., TATO P., et al. – Field trial for reducing porcine *Taenia solium* cysticercosis in Mexico by systematic vaccination of pigs. – Veterinary Parasitology, 1997, 69, p. 55-63.

MOLINARI J. L., TATO P., LARA-AGUILERA R., et al. – Effects of serum from neurocysticercosis patients on the structure and viability of *Taenia solium* oncospheres. – Journal of Parasitology, 1993a, 79, p. 124-127.

MOLINARI J. L., SOTO R., TATO P., et al. – Immunization against porcine cysticercosis in an endemic area in Mexico : a field and laboratory study. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1993b, 49, p. 502-512.

MOLINARI J. L., TATO P. – Molecular determinants of host – parasite interactions : Focus on parasite. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* cysticercosis. From basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 25-33.

MONTEIRO L., COELHO T., STOCKER A. – La neurocysticercose, une parasitose fréquente au Portugal. 138 cas diagnostiqués par scanographie cérébrale. – Presse Médicale, 1987, 16, p. 964.

MONTEIRO L., NUNES B., MENDONÇA D., et al. – Spectrum of epilepsy in neurocysticercosis : a long-term follow-up of 143 patients. – Acta Neurologica Scandinavica, 1995, 92, p. 33-40.

MOORE A. C., LUTWICK L. I., SCHANTZ P. M., et al. – Seroprevalence of cysticercosis in an orthodox jewish community. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1995, 53, p. 439-442.

MORALES J., VELASCO T., TOVAR V., et al. – Castration and pregnancy of rural pigs significantly increase the prevalence of naturally acquired *Taenia solium* cysticercosis. – Veterinary Parasitology, 2002, 108, p. 41-48.

MORGAN U. M., XIAO L., FAYER R., et al. – Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* isolates from captive reptiles using 18S rDNA sequence data and random amplified polymorphic DNA analysis. – Journal of Parasitology, 1999, 85, p. 525-530.

MYDYNski L. J., DICK T. A. – The use of enzyme polymorphisms to identify genetic differences in the genus *Trichinella*. – Journal of Parasitology, 1985, 71, p. 671-677.

NAKAO M., OKAMOTO M., SAKO Y., et al. – A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. – Parasitology, 2002, 124, p. 657-662.

NEWELL E., VYUNGIMANA F., GEERTS S., et al. – Prevalence of cysticercosis in epileptics and members of their families in Burundi. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1997, 91, p. 389-391.

NGUEKAM A., ZOLI A.P., VONDOU L., et al. – Kinetics of circulating antigens in pigs experimentally infected with *Taenia solium* eggs. – *Veterinary Parasitology*, 2003a, 111, p. 323-332.

NGUEKAM, ZOLI A.P., ONGOLO-ZOGO P., et al. – Follow-up of neurocysticercosis patients after treatment using an antigen detection ELISA. – *Parasite*, 2003b, 10, p. 65-68.

NGUEKAM J. P., ZOLI A. P., ZOGO P. O., et al. – A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. – *Tropical Medicine and International Health*, 2003c, 8, p. 144-149.

NIETO D. – Historical notes on cysticercosis. In : Flisser A., Willms K., Lacleste J. P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. Eds. *Cysticercosis : Present State of Knowledge and Perspectives*. – New York : Academic Press, 1982, p. 1-7.

NUNES, C.M., FERRAZ LIMA L. G., MANOEL C. S., et al. – *Taenia saginata* : polymerase chain reaction for taeniasis diagnosis in human faecal samples. – *Experimental Parasitology*, 2003, 104, p. 67-69.

ODAMTTEN S. E., LAING W. N. – Cysticercosis of the Brain. – *Ghana Medical*, 1967, 6, p. 97-105.

OGUNKOLADE B. W., ROBINSON H. A., MCDONALD V., et al. – Isoenzyme variation within the genus *Cryptosporidium*. – *Parasitology Research*, 1993, 79, p. 385-388.

OKAMOTO M., ITO A., KUROSAWA T., OKU Y., et al. – Intraspecific variation of isoenzymes in *Taenia taeniaeformis*. – *International Journal for Parasitology*, 1995, 25, p. 221-228.

OKAMOTO M., NAKAO M., SAKO Y., et al. – Molecular variation of *Taenia solium* in the world. – *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2001, 32, suppl. 2, p. 90-93.

ONAH D. N., CHIEJINA S. N. – *Tænia solium* cysticercosis and human taeniasis in the Nsukka area of Enugu State, Nigeria. – *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1995, 89, p. 399-407.

OSKAM L., PRATLONG F., ZIJLSTRA E. E., et al. – Biochemical and molecular characterization of *Leishmania* parasites isolated from an endemic focus in eastern Sudan. – *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 92, p. 120-122.

PANIAGUA E., VILAS R., SANMARTÍN M. L., et al. – Characterization by enzyme electrophoresis of specimens of the genus *Helicometra* (Trematoda, Opecoelidae) from fish caught off the coast of Northwest Spain. – *Parasite*, 1999, 6, p. 89-91.

PARKER F., HLADKY J. P., BRETON J. O., et al. – Cysticercose racémeuse de la queue de cheval et arachnoïdite kystique. A propos de deux cas. – *Neurochirurgie*, 1988, 34, p. 280-285.

PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., et al. – Manuel technique de génétique par électrophorèse des protéines. – *Techniques et documentation*, Paris : Lavoisier, 1987, 213 p.

PATHAK K. M. L., GAUR S. N. S. – Immunization of pigs with culture antigens of *Tænia solium*. – *Veterinary Parasitology*, 1990, 34, p. 353-356.

PAWLOWSKI Z. S. – Perspectives on the control of *Tænia solium*. – *Parasitology Today*, 1990, 6, p. 371-373.

PAWLOWSKI Z. S. – Efficacy of low doses of praziquantel in taeniasis. – *Acta Tropica*, 1991, 48, p. 83-88.

PHIRI I. K., DORNY P., GABRIEL S., et al. – The prevalence of porcine cysticercosis in Eastern and Southern provinces of Zambia. – *Veterinary Parasitology*, 2002, 18, p. 31-39.

PIARROUX R., TROUVÉ V., PRATLONG F., et al. – The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of 'Old World' *Leishmania* species. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 88, p. 475-478.

PLANCARTE A., FLISSER A., GAUCI C. G., et al. – Vaccination against *Taenia solium* cysticercosis in pigs using native and recombinant oncosphere antigens. – International Journal for Parasitology, 1999, 29, p. 643-647.

PREUX P.-M., MELAKU Z., DRUET-CABANAC M., et al. – Cysticercosis and neurocysticercosis in Africa : current status. – Neurological Infections and Epidemiology, 1996, 1, p. 63-68.

RABIELA-CERVANTES M. T., RIVAS-HERNÁNDEZ A., RODRIGUEZ-IBARRA J., et al. – Anatomopathological aspects of human brain cysticercosis. In : Flisser A., Willms K., Lacleste J. P., Larralde C., Ridaura C., Beltran F. Eds. Cysticercosis : Present State of Knowledge and Perspectives. – New York : Academic Press, 1982, p. 179-200.

RAJAONARISON P., RALAMBOSON S., ANDRIAMAMONJY C., et al. – Diagnostic de la neurocysticercose : à propos d'un cas. – Archives de l'Institut Pasteur de Madagascar, 2001, 67, p. 53-56.

RISHI A. K., MCMANUS D. P. – Molecular cloning of *Taenia solium* genomic DNA and characterization of taeniid cestodes by DNA analysis. – Parasitology, 1988, 97, p. 161-176.

RODRIGUEZ-CANUL R., ALLAN J. C., FLETES C., et al. – Comparative evaluation of purified *Taenia solium* glycoproteins and crude metacestode extracts by immunoblotting for the serodiagnosis of human *T. solium* cysticercosis. – Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 1997, 4, p. 579-582.

RODRIGUEZ-CANUL R., FRASER A., ALLAN J. C., et al. – Epidemiological study of *Taenia solium* taeniasis / cysticercosis in a rural village in Yucatan State, Mexico. – Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 1999, 93, p. 57-67.

RODRIGUEZ-HIDALGO R., GEYSEN D., BENÍTEZ-ORTIZ W., et al. – Comparison of conventional techniques to differentiate between *Taenia solium* and *Taenia saginata* and an improved Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism assay using a mitochondrial 12S rDNA fragment. – Journal of Parasitology, 2002, 88, p. 1007-1011.

RUBERTI R. F., MWINGI S. M. G., DEKKER N., et al. – Epilepsy in the Kenyan Africans. – African Journal of the Neurological Sciences, 1985, 4, p. 1-3.

SACKS L. V., BERKOWITZ I. – Cysticercosis in an urban black South African community : prevalence and risk factors. – Tropical Gastroenterology, 1990, 11, pp. 30-33.

SALIOU P., HERVÉ V., BOUGIER Y., et al. – La cysticerose intra-vitréenne, une pathologie d'importation rare. A propos d'une observation. – Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1984, 77, p. 686-689.

SALINAS R., COUNSELL C., PRASAD K., et al. – Treating neurocysticercosis medically: a systematic review of randomized, controlled trials. – Tropical Medicine and International Health, 1999, 4, p.713-718.

SANCHEZ A. L., MEDINA M. T., LJUNGSTRÖM I. – Prevalence of taeniasis and cysticercosis in a population of urban residence in Honduras. – Acta Tropica, 1998, 69, p. 141-149.

SANDOVAL H., MANGA-GONZÁLEZ Y., CAMPO R., et al. – Preliminary study on genetic variability of *Dicrocoelium dentriticum* determined by random amplified polymorphic DNA. – Parasitology International, 1999, 48, p. 21-26.

SARTI E., SCHANTZ P. M., PLANCARTE A., et al. – Epidemiological investigation of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in a rural village of Michoacan State, Mexico. – Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 1994, 88, p. 49-52.

SARTI E. – Epidemiology of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in Mexico. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 83-90.

SATO M. O., YAMASAKI H., SAKO Y., et al. – Evaluation of tongue inspection and serology for diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis in swine: usefulness of ELISA using purified glycoproteins and recombinant antigen. – *Veterinary Parasitology*, 2003, 111, p. 309-322.

SCHANTZ P. M., CRUZ M., SARTI E., PAWLOWSKI Z. – Potential eradicability of taeniasis and cysticercosis. – *Bulletin of Pan American Health Organization*, 1993, 27, p. 397-403.

SCHANTZ P. M., MOORE A. C., MUÑOZ J. L., et al. – Neurocysticercosis in an orthodox jewish community in New York City. – *New England Journal of Medicine*, 1992, 327, p. 692-695.

SCIUTTO E., FRAGOSO G., MANOUTCHARIAN K., et al. – New approaches to improve a peptide vaccine against porcine *Taenia solium* cysticercosis. – *Archives of Medical Research*, 2002, 33, p. 371-378.

SCIUTTO E., FRAGOSO G., FLEURY A., et al. – *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. – *Microbes and Infection*, 2000, 2, p. 1875-1890.

SHAMSUZZAMAN S. M., FURUYA MASATO, SHAMSUZZAMAN CHOUDHURY A. K. M., et al. – Characterisation of Bangladeshi *Leishmania* isolated from kala-azar patients by isoenzyme electrophoresis. – *Parasitology International*, 2000, 49, p. 139-145.

SHASHA W, PAMMENTER M. D. – Sero-epidemiological studies of cysticercosis in school children from two rural areas of Transkei, South Africa. – *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1991, 85, p. 349-355.

SHASHA W., VAN DELLEN J., CAKATA E. – Cysticercosis: an analysis of 141 cases in South Africa. – South African Journal of Epidemiology and Infection, 1986, 1, p. 94-97.

SILES-LUCAS M., CUESTA-BANDERA C., CÉSAR-BENITO M. – Random amplified polymorphic DNA technique for the speciation studies of *Echinococcus granulosus*. – Parasitology Research, 1993, 79, p. 343-345.

SIMANJUNTAK G. M., MARGONO S. S., OKAMOTO M., et al. – Taeniasis / Cysticercosis in Indonesia as an emerging disease. – Parasitology Today, 1997, 13, p. 321-323.

SINGH G., PRABHAKAR S., ITO A., et al. – *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis in Asia. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 111-127.

SINGH G. – Neurocysticercosis in South-Central America and the Indian subcontinent. A comparative evaluation. – Arquivos de Neuro-Psiquiatria, 1997, 55, p. 349-356.

SIRE C., DURAND P., POINTIER J. P., et al. – Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population : a field study using random amplified polymorphic DNA markers. – Journal of Parasitology, 1999, 85, p. 436-441.

ŠNÁBEL V., VÁRADY M., CHRISTENSEN C. M., et al. – Genetic diversity in porcine *Oesophagostomum dentatum* and *O. quadrispinulatum* and their delineation by isoenzyme analysis. – Parasitology Research, 1998, 84, p. 112-116.

SORVILLO F. J., WATERMAN S. H., RICHARDS F. O., et al. – Cysticercosis surveillance: locally acquired and travel-related infections and detection of intestinal tapeworm carriers in Los Angeles County. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1992, 47, p. 365-371.

SOTELO J., MARIN C. – Hydrocephalus secondary to cysticercotic arachnoiditis. A long-term follow-up review of 92 cases. – *Journal of Neurosurgery*, 1987, 66, p. 686-689.

SOTELO J., GUERRERO V., RUBIO F. – Neurocysticercosis : a new classification based on active and inactive forms. A study of 753 cases. – *Archives of Internal Medicine*, 1985a, 145, p. 442-445.

SOTELO J., TORRES B., RUBIO-DONNADIEU F., et al. – Praziquantel in the treatment of neurocysticercosis : Long-term follow-up. – *Neurology*, 1985b, 35, p. 752-755.

SUTISNA I. P., FRASER A., KAPTI I., et al. – Community prevalence study of taeniasis and cysticercosis in Bali, Indonésia. – *Tropical Medicine and International Health*, 1999, 4, p. 288-294.

TAKAYANAGUI O., JARDIM E. – Therapy for neurocysticercosis : comparison between albendazole and praziquantel. – *Archives of Neurology*, 1992, 49, p. 290-294.

THEIS J. H., CLEARY M., SYVANEN M., et al. – DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. – *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1996, 55, p. 456-458.

THOMPSON R. C. A., LYMBERY A. J., CONSTANTINE C. C. – Variation in *Echinococcus* : Towards a taxonomic revision of the genus. – In : *Advances in Parasitology*, Academic Press, 1995, vol. 35, p. 145-176.

TOLEDO A., MARTÍN-SÁNCHEZ J., PESSON B., et al. – Genetic variability within species *Leishmania infatum* by RAPD. A lack of correlation with zymodeme structure. – *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2002, 119, p. 257-264.

TSANG V. C. W., BRAND J. A., BOYER A. E. – An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *Journal of Infectious Diseases*, 1989, 159, p. 50-59.

TSANG V. C. W., WILSON M. – *Taenia solium* cysticercosis : an under-recognized but serious public health problem. – Parasitology today, 1995, 11, p. 124-126.

TUCH P. S., SAFFER D. – Cerebral cysticercosis : a case report and review of literature. – South African Medical Journal, 1984, 65, p. 211-216.

VANDERICK F. X., MOBORYINGABO P. – La cysticerose humaine au Rwanda. – Annales de la Société de Belge de Médecine Tropicale, 1972, 52, p. 153-155.

VILHENA M., SANTOS M., TORGAL J. – Seroprevalence of human cysticercosis in Maputo, Mozambique. – American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1999, 61, p. 59-62.

WADIA N. H., SINGH G. – *Taenia solium* : a historical note. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Taenia solium* Cysticercosis: from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 157-168.

WEBBE G. – Human cysticercosis: parasitology, pathology, clinical manifestations and available treatment. – Pharmacology and Therapeutics, 1994, 64, p. 175-200.

WELSH J., MCCLELLAND M. – Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. – Nucleic Acids Research, 1990, 18, p. 7213-7218.

WHITE A. C., Jr, ROBINSON P., KUHN R. *Taenia solium* cysticercosis : Host- Chemical Immunology parasite interactions and the immune response. In : Freedman D.O. Ed. Immunopathogenetic aspects of disease induced by helminth parasites. Karger : Basel , 1997a, 66, p. 209-230. – (Chemical Immunology).

WHITE A. C., Jr. – Neurocysticercosis : a major cause of neurological disease worldwide. – Clinical Infectious Diseases, 1997b, 24, p. 101-115.

WHITE A. C., Jr. – Neurocysticercosis : Updates on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and management. – Annual Reviews of Medicine, 2000, 51, p. 187-206.

WILLIAMS J. G. K., KUBELIK A. R., LIVAK K. J., et al. – DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. – Nucleic Acids Research, 1990, 18, p. 6531-6535.

WILSON M., BRYAN R. T., FRIED J. A., et al. – Clinical evaluation of the cysticercosis Enzyme-linked Immuno-electrotransfer Blot in patients with neurocysticercosis. – Journal of Infectious Diseases, 1991, 164, p. 1007-1009.

YAKOLEFF-GREENHOUSE V., FLISSER A., SIERRA A., et al. – Analysis of antigenic variation in cysticerci of *Taenia solium*. – Journal of Parasitology, 1982, 68, p. 39-47.

YAMASAKI H., NAKAO M., SAKO Y., et al. – DNA differential diagnosis of human taeniid cestodes by base excision sequence scanning thymine-base reader analysis with mitochondrial genes. – Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40, p. 3818-3821.

YEH F. C., YANG R. C., BOYLE T. B. J. , et al. – Popgene ver 1.31 : the user-friendly shareware for population genetic analysis. – Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.

ZARDI E. M., PETRARCA V., POZIO E., et al. – A case from India of neurocysticercosis responsive to albendazole treatment. – Parasite, 2000, 7, p. 54-59.

ZILLMANN U., EBERT F. – The characterization of *Trypanosoma cruzi* stocks by starch-gel electrophoresis, comparison of results with those of isoelectric focusing. – Tropenmedizin und Parasitologie, 1983, 34, p. 84-88.

ZINI D., FARRELL V. J. R., WADEE A. A. – The relationship of antibody levels to the clinical spectrum of human neurocysticercosis. – Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry, 1990, 53, p. 656-661.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Protocole de prélèvement de cysticerques pour une étude de polymorphisme génétique

Objectifs :

- Récolter des cysticerques non calcifiés (*Cysticercus cellulosae*) d'origine porcine ou humaine pour une étude de polymorphisme génétique.
- Récolter des échantillons du tissu environnant le kyste.

I - Prélèvement d'échantillons d'origine porcine :

- Aussitôt que possible après la mort de l'animal, prélever dans diverses parties anatomiques de l'animal un morceau de viande infectée par des cysticerques.
- Mettre les morceaux prélevés dans des sachets plastiques propres (un morceau par sachet).
- Identifier chaque sachet en inscrivant dessus à l'aide d'un marqueur indélébile un code bien lisible. Le code commence par les deux lettres désignant le pays (voir tableau I) suivi de P (comme "pig") puis d'un numéro à deux chiffres (le n° 01 désigne le premier individu prélevé, le n° 02, le deuxième, etc...) et enfin la localisation anatomique de la viande (voir tableau II). Par exemple :

MX-P01-TO (morceau de langue provenant du porc n° 01, au Mexique)

MX-P01-HE (morceau de cœur provenant du porc n° 01, au Mexique)

- Garder les sachets dans de la glace pilée pendant le transport éventuel jusqu'au lieu de dissection.

Dissection :

Pendant la dissection, garder les morceaux de viande ainsi que les tubes qui recevront les échantillons dans de la glace pilée.

Pour chaque morceau de viande, préparer 4 tubes de 2 ml (type NUNC).

1 – Prélever les cysticerques un à un et de façon qu'il n'y ait aucune trace de tissu de l'hôte. Pour cela, procéder comme suit :

- ♦ A l'aide d'un scalpel, dégager le cysticerque du tissu qui l'entoure en faisant attention de ne pas le percer.
- ♦ Avec une pince, tirer doucement sur le cysticerque. Celui-ci doit se détacher facilement. Si ce n'est pas le cas, il reste encore un peu de tissu de l'hôte. Ne pas forcer pour ne pas faire éclater le cysticerque. Dégager un peu plus avec le scalpel.

- ♦ Rincer rapidement le cysticerque dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9% : 9g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée).

- ♦ Essuyer légèrement le cysticerque sur du papier buvard propre pour éliminer l'excès d'eau physiologique.

- ♦ Le mettre dans un tube de 2 ml (type NUNC) que l'on gardera dans la glace pilée.

- ♦ Mettre les cysticerques dans deux tubes à raison de 20 cysticerques par tube. Si on ne peut pas avoir les 20 cysticerques, répartir le nombre obtenu dans deux tubes. Reporter sur les tubes le code donné au morceau de viande suivi de la lettre C ainsi que la date de prélèvement (DD/MM/AA). Exemple :

MX-P01-TO-C (cysticerques prélevés la langue du porc n°01), 23/07/00.

- ♦ Dans l'un des tubes, ajouter 1 ml d'éthanol à 70% (70 ml d'éthanol absolu + 30 ml d'eau distillée). L'autre tube sera immédiatement congelé, ou au moins conservé aussi froid que possible avant la congélation. Une fois congelé, il ne doit plus être décongelé.

2 – Prélever aussi quelques échantillons du tissu environnant sans la graisse et sans les cysticerques (une dizaine de petits morceaux de la taille d'un petit pois répartis également dans deux tubes). Rincer rapidement dans de l'eau physiologique (NaCl à 0,9%). Éliminer l'excès d'eau en essuyant légèrement sur du papier buvard. Reporter sur les tubes le code donné au morceau de viande ainsi que la date (DD/MM/AA). Comme pour les échantillons de cysticerques, ajouter 1 ml d'éthanol à 70% dans l'un des tubes. L'autre tube sera immédiatement congelé.

II – Prélèvements d'origine humaine :

► Échantillons de cysticerques :

- Les cysticerques issus de localisations différentes seront mis dans des tubes différents même s'ils proviennent du même patient.

- Identifier les tubes par un code lisible et la date de prélèvement (DD/MM/AA). Le code commence par les deux lettres désignant le pays (voir tableau I) suivi de H (comme "human") puis d'un numéro à deux chiffres (le numéro de l'individu) et enfin la localisation anatomique (voir tableau II). Par exemple :

MX-H01-BA (cysticerque(s) prélevé(s) dans le dos de l'individu n° 01, au Mexique), 23/07/00.

- Si on peut avoir plusieurs cysticerques pour une localisation donnée, les répartir dans deux tubes. L'un des prélèvements sera conservé dans l'éthanol à 70% et l'autre tube sera congelé.

Si on ne peut prélever qu'un seul cysticerque sur un patient, il faut privilégier la conservation dans l'éthanol à 70%.

► Prélèvement de sang :

- Le prélèvement se fait au bout du doigt avec une lancette.
- Le sang sera recueilli sur du papier filtre épais (type Whatmann 3MM). Disposer 4 à 5 taches de sang de 1 cm de diamètre (3-4 gouttes de sang par tache) sur un rectangle de papier filtre de 5 × 10 cm. Bien imbiber le papier filtre.
- Identifier chaque papier filtre par un code bien lisible suivi de la date de prélèvement (DD/MM/AA). Le code commence par les deux lettres désignant le pays (voir tableau I), suivi de H (comme "human") puis d'un numéro à deux chiffres (le numéro de l'individu). Par exemple :

MX-H01 (prélèvement de sang de l'individu n° 01, au Mexique), 23/07/00

- Laisser sécher le papier filtre avant de le conserver dans un endroit sec, à l'abri de la lumière et de la poussière.

III - Conservation :

- Les tubes contenant de l'éthanol à 70% peuvent être conservés à température ambiante. S'assurer que les tubes sont bien fermés pour éviter que l'alcool ne s'évapore.
- Les autres tubes doivent être conservés à une température inférieure à -50°C dans un congélateur ultra froid. Les échantillons seront seulement conservés à -20°C lorsque aucune alternative n'est possible. Eviter de soumettre les tubes à des cycles de congélation / décongélation.

- Si on ne dispose pas de possibilité de congélation, les échantillons seront uniquement conservés dans de l'éthanol à 70%.

IV - Transport / Envoi :

- Les tubes contenant de l'éthanol à 70% et les papiers filtres imprégnés de sang peuvent être transportés dans des boîtes de rangement en respectant les règles d'envoi de matériel biologique.
- Les tubes congelés peuvent être placés dans une boîte en polystyrène remplie de carboglace. Cette boîte sera ensuite placée dans une autre boîte plus grande remplie elle aussi de carboglace.
- L'envoi des tubes se fera par transporteur spécialisé (DHL ou équivalent).

V - Fiche de renseignement :

Pour chaque prélèvement, remplir une fiche de renseignement (voir modèle après les tableaux).

Tableau I :

Pays	Code
Angola	AO
Bénin	BJ
Bolivie	BO
Brésil	BR
Burundi	BI
Cameroun	CM
Congo	CG
Côte d'Ivoire	CI
Equateur	EC
Guatemala	GT
Honduras	HN
Inde	IN
Indonésie	ID
Madagascar	MG
Mexique	MX
Pérou	PE
Portugal	PT
Togo	TG
Uruguay	UY
Vietnam	VN

Tableau II :

Localisation	Code
Abdomen	AB
Cerveau	BR
Cœur	HE
Dos	BA
Langue	TO
Membre postérieur. droit	RLL
Membre postérieur. gauche	LLL
Membre antérieur. droit	RUL
Membre antérieur. gauche	LUL
Œil droit	RE
Œil gauche	LE
Thorax	TH

Fiche de renseignement

Date :

Code :

Lieu du prélèvement (ville, pays) :

Origine du prélèvement (humaine ou porcine) :

Si origine humaine, renseignement sur la personne :

- Nom :

- Prénoms :

- Age :

- Sexe :

- Profession :

- Lieu d'habitation :

Si origine porcine, lieu où l'animal a été élevé (si possible) :

Remarque éventuelle :

Protocol of sampling cysticerci for studying genetic polymorphism

Objectives :

- To collect not calcified cysts of *C. cellulosae* from pigs or humans to study genetic polymorphism.
- To collect samples from tissue surrounding the cyst.

I - Sample collection from pig :

- As soon as possible after the death of the animal, take in diverse parts of the animal (tongue, heart, brain, back, limb,...) a piece of meat infected with cysticerci.
- Put each piece of meat in a plastic bag and identify the plastic bag by a code. The code should be written with permanent ink, water-proof on plastic surface.
- The code begins by two letters which refer to the country (see table I), then P (as "pig"), a two figure number (e.g. 01 for the first pig, 02 for the second,...) and the anatomical site (see table II).

For example :

- MX-P01-TO (piece of tongue of the pig number 01, in Mexico).
- MX-P01-BA (meat taken from the back of the pig number 01, in Mexico).
- Keep the plastic bag on ice (or refrigerated container) during the transport to the laboratory or the place where dissection will be proceeded.

Dissection :

NB : The piece of meat and the tubes in which the samples will be collected must be kept on ice or in refrigerated container during the dissection.

For each piece of infected meat, prepare 4 tubes of 2 ml (type NUNC).

1 – Take the cyst one by one and without host's tissue. To do this, proceed as follow :

- ♦ Extricate the cyst from the host's tissue with a scalpel. Care must be taken to avoid perforating the cyst.
- ♦ With tweezers, pull carefully on the cyst. It should come free easily. If it's not the case, there would be some host's tissue around the cyst. Do not force it to avoid bursting of the cyst. Extricate a little more with the scalpel.

- ◆ Rinse rapidly the cyst in physiological saline solution (0.9% w/v NaCl : 9 g of NaCl into 1 liter of water).

- ◆ Remove excess water by a light contact with a clean absorbent paper.

- ◆ Put the cyst in a 2 ml tube. The tube must be kept on ice (or refrigerated container).

- ◆ Proceed the same way until getting two tubes of 20 cysts each. If one can't get 20 cysts per tube, divide the cysts obtained into two tubes. Report to the tubes the code given to the meat followed by C and the date of sampling (DD/MM/YY). For example :

MX-P01-TO-C (cysticerci from the tongue of the pig n°01), 23/07/00.

- ◆ In one of the tubes, add 1 ml of 70% ethanol (70 ml absolute ethanol + 30 ml distilled water). The other tube should be frozen immediately, or at least kept as cold as possible prior to freezing. Once frozen, they should not be allowed to thaw.

2 – Take also some samples of the tissue surrounding the cysts without fat or cysts (about 10 bits of peas size). Excess fat should be trimmed from the tissue. Rinse the tissue in physiological saline (0.9% NaCl). Remove excess water by a light contact with a clean absorbent paper. Divide the tissue samples into two tubes. Report to the tubes the code of the meat and the date of sampling (DD/MM/YY). In one of the two tubes, add 1 ml of 70% ethanol. The other tube should be frozen immediately.

II - Sample collection from humans :

- ▶ Samples of cysts :

- The cysts of different localisations must be put in different tubes even if they come from the same patient.

- Identify the tube(s) by a legible code and the date of sampling (DD/MM/YY). The code begins by two letters referring to the country (see table I), then H (as "human"), a two figure number (the number of the individual : e.g., 01 for the first person, 02 for the second,...) and finally the anatomical site (see table II). For example :

MX-H01-BA (cysticerci taken from the back of the patient n°01, in Mexico), 23/07/00.

- If one can get more than one cyst for a given anatomical site, divide them into two tubes. In one of the tubes, add about 1 ml of 70% ethanol. The other tube should be frozen immediately, or at least kept as cold as possible prior to freezing.

- If only one cyst was taken from the patient, it should be stored in 70% ethanol.

- ▶ Blood samples :

- Sample is done by fingerpricks by a lancet.

- Blood is collected on a thick filter paper (type Whatmann 3MM). Lay 4 to 5 spots of 1 cm diameter (3 to 4 drops of blood per spot) on a filter paper of 5 × 10 cm. Moisten well the filter paper.

- Identify the filter paper by a legible code and the date of sampling (DD/MM/YY). The code begins by two letters referring to the country (see table I), then H (as "human"), and a two figure number (the number of the individual).

- For example : MX-H01 (blood sample from the person number 01, in Mexico), 23/07/00.

- Let the filter paper drying before storing in a dry place sheltered from daylight and dust.

III – Storage :

- The tubes containing 70% ethanol can be stored at room temperature. Make sure that the tubes are closed conveniently to avoid evaporation of the ethanol.

- The other tubes should be stored below –50°C in an ultra-cold freezer. Samples should only be stored at –20°C where no alternative is available. Cycle of freezing / thawing must be avoided.

- If there is no possibility of freezing, the samples will only be stored in 70% ethanol.

IV – Transport / Dispatching :

- The tubes containing 70% ethanol and the filter papers impregnated with blood can be transported in a storage box, by respecting the dispatching regulations of biological materials.

- Frozen tubes can be conveniently transported for short trip (i. e. less than 12 hours) in a polystyrene container filled with dry ice. For longer trips a small polystyrene container inside a large container both filled with dry ice can be used.

- Sending will be made by specialized carrier (DHL or equivalent).

V – Information card :

For each sample, fill an information card (see example attached).

Table I :

Country	Code
Angola	AO
Benin	BJ
Bolivia	BO
Brazil	BR
Burundi	BI
Cameroon	CM
Congo	CG
Ivory Coast	CI
Ecuador	EC
Guatemala	GT
Honduras	HN
India	IN
Indonesia	ID
Madagascar	MG
Mexico	MX
Peru	PE
Portugal	PT
Togo	TG
Uruguay	UY
Vietnam	VN

Table II :

Anatomical site	Code
Abdomen	AB
Back	BA
Brain	BR
Heart	HE
Left eye	LE
Left lower limb	LLL
Left upper limb	LUL
Right eye	RE
Right lower limb	RLL
Right upper limb	RUL
Thorax	TH
Tongue	TO

Information card

Date :

Code :

Origin of the sample (human or swine) :

Place of sampling (town, country) :

If human origin, information about the person :

- Name :

- First name :

- Age :

- Sex :

- Occupation :

- Place of residence :

If swine origin, place where the animal was bred (if possible) :

Comments :

ANNEXE 2 : Liste des échantillons analysés en RAPD

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
M	MADA	Cysticerque		Antananarivo	
1	MG-101-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	Calcification : ++
2	MG-101-C02	Cysticerque	Echine		
3	MG-101-C03	Cysticerque	Poitrine		
4	MG-101-C04	Cysticerque	Ventre		
5	MG-102-C01	Cysticerque	Cuisse	Antananarivo	
6	MG-102-C02	Cysticerque	Oreille		
7	MG-102-C03	Cysticerque	Poitrine		
8	MG-103-C01	Cysticerque	Cœur	Antananarivo	
9	MG-103-C02	Cysticerque	Langue		
10	MG-104-C01	Cysticerque	Ventre	Antananarivo	
11	MG-105-C01	Cysticerque	Muscle	Antananarivo	
12	MG-106-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
13	MG-107-C01	Cysticerque	Filet	Antananarivo	
14	MG-108-C01	Cysticerque	Muscle	Antananarivo	
15	MG-109-C01	Cysticerque	Oreille	Antananarivo	
16	MG-110-C01	Cysticerque	Epaule	Antananarivo	
17	MG-111-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
18	MG-111-C02	Cysticerque	Cœur		
19	MG-112-C01	Cysticerque	Dos	Antananarivo	
20	MG-113-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	Tissu : ++
21	MG-113-C02	Cysticerque	Cœur		
22	MG-113-C03	Cysticerque	Filet		Tissu : +
23	MG-114-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
24	MG-114-C02	Cysticerque	Cœur		
25	MG-115-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
26	MG-115-C02	Cysticerque	Cœur		
27	MG-116-C01	Cysticerque	Filet	Antananarivo	
28	MG-116-C02	Cysticerque	Filet		
29	MG-117-C01	Cysticerque	Filet	Fianarantsoa	
30	MG-118-C01	Cysticerque	Filet	Fianarantsoa	
31	MG-119-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
32	MG-119-C02	Cysticerque	Cœur		
33	MG-120-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
34	MG-120-C02	Cysticerque	Cœur		
35	MG-121-C01	Cysticerque	Langue	Antananarivo	
36	MG-121-C02	Cysticerque	Cœur		
37	MG-122-C01	Cysticerque	Cœur	Antananarivo	

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
38	BU-P01-C01	Cysticerque	Langue	Kayanza	
39	BU-P01-C02	Cysticerque	Cœur		
40	BU-P01-C03	Cysticerque	Cuisse		
41	BU-P02-C01	Cysticerque	Langue	Kayanza	
42	BU-P03-C01	Cysticerque	Langue	Kayanza	
43	BU-P03-C02	Cysticerque	Cuisse		Tissu : +
44	BU-P03-C03	Cysticerque	Masséter		
45	BU-P03-C04	Cysticerque	Membre antérieur		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
46	BU-P04-C01	Cysticerque	Langue	Kayanza	
47	BU-P04-C02	Cysticerque	Cœur		
48	BU-P04-C03	Cysticerque	Cuisse		
49	BU-P04-C04	Cysticerque	Masséter		
50	BU-P04-C05	Cysticerque	Membre antérieur		
51	BU-P04-C06	Cysticerque	Diaphragme		Tissu : +++
52	BU-P04-C07	Cysticerque	Cou		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
68	MX-P03-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Zacatepec, Morelos	
69	MX-P03-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
70	MX-P03-C03	Cysticerque	Diaphragme		
71	MX-P04-C01	Cysticerque	Membre post. gche	Huatlatlahuaca, Puebla	
72	MX-P04-C02	Cysticerque	Membre ant. droit		
73	MX-P04-C03	Cysticerque	Membre ant. gche		
74	MX-P04-C04	Cysticerque	Membre post. droit		
75	MX-P05-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Huatlatlahuaca, Puebla	
76	MX-P05-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
77	MX-P05-C03	Cysticerque	Diaphragme		
78	MX-P06-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Zacatepec, Morelos	
79	MX-P06-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
80	MX-P06-C03	Cysticerque	Diaphragme		
81	MX-P06-C04	Cysticerque	Membre ant. droit		
82	MX-P06-C05	Cysticerque	Membre ant. gche		
83	MX-P07-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Zacatepec, Morelos	
84	MX-P07-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
85	MX-P07-C03	Cysticerque	Diaphragme		
86	MX-P07-C04	Cysticerque	Membre ant. droit		
87	MX-P07-C05	Cysticerque	Membre ant. gche		
88	MX-P07-C06	Cysticerque	Cerveau		
89	MX-P08-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Zacatepec, Morelos	
90	MX-P08-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
91	MX-P08-C04	Cysticerque	Membre ant. droit		
92	MX-P08-C05	Cysticerque	Membre ant. gche		
93	MX-P09-C01	Cysticerque	Membre antérieur	Koshol, Yucatan	
94	MX-P09-C02	Cysticerque	Membre postérieur		
95	MX-P09-C03	Cysticerque	Cerveau		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
96	MX-P10-C01	Cysticerque	Membre antérieur	Koshol, Yucatan	
97	MX-P10-C02	Cysticerque	Membre postérieur		
98	MX-P10-C03	Cysticerque	Cerveau		
99	MX-P11-C01	Cysticerque	Membre antérieur	Zacatepec, Morelos	
100	MX-P11-C02	Cysticerque	Membre postérieur		
101	MX-P11-C03	Cysticerque	Cerveau		
102	MX-P12-C01	Cysticerque	Membre post. droit	Zacatepec, Morelos	
103	MX-P12-C02	Cysticerque	Membre post. gche		
104	MX-P12-C03	Cysticerque	Diaphragme		
105	MX-P12-C04	Cysticerque	Membre ant. gche		
106	MX-P13-C01	Cysticerque	Membre postérieur	Zacatepec, Morelos	
107	MX-P13-C02	Cysticerque	Membre antérieur		
108	MX-P13-C03	Cysticerque	Cerveau		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
109	MX-P14-C01	Cysticerque	Membre postérieur	Cuantepec, Morelos	
110	MX-P14-C02	Cysticerque	Membre antérieur		
111	MX-P14-C03	Cysticerque	Cerveau		
112	MX-P15-C01	Cysticerque	Membre postérieur	Cuantepec, Morelos	
113	MX-P15-C02	Cysticerque	Membre antérieur		
114	MX-P15-C03	Cysticerque	Cerveau		
115	MX-P16-C01	Cysticerque	Membre postérieur	Cuantepec, Morelos	
116	MX-P16-C02	Cysticerque	Membre antérieur		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
54	CM-P02-C01	Cysticerque	Membre post. gche		
55	CM-P02-C02	Cysticerque	Dos		Calcification : ++
56	CM-P03-C01	Cysticerque	Thorax		
57	CM-P03-C02	Cysticerque	Dos		
58	CM-P04-C01	Cysticerque	Membre ant. droit		
59	CM-P04-C02	Cysticerque	Dos		
60	CM-P05-C01	Cysticerque	Cerveau		
61	CM-P05-C02	Cysticerque	Dos		

N°	Code	Nature	Localisation	Lieu de pvt	Remarque
119	EC-P02-C01	Cysticerque			
120	EC-P03-C01	Cysticerque			
121	EC-P04-C01	Cysticerque			
122	EC-P05-C01	Cysticerque			
123	EC-P05-C02	Cysticerque			
124	EC-P06-C01	Cysticerque			
125	EC-P07-C01	Cysticerque			
T10	TSPP-01	Anneau		Atuntaqui, Imbabura	
T13	TSPP-04	Anneau		Quito, Pichincha	

N°	Code	Nature		Lieu de pvt	Remarque
T01	TSAG-01	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T02	TSAG-02	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T03	TSAG-03	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T04	TSAG-04	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T06	TSAG-06	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T07	TSAG-07	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T08	TSAG-08	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T09	TSAG-09	Anneau		Limoges, Hte-Vienne	
T11	TSPP-02	Anneau		Bolivari, Equateur	
T12	TSPP-03	Anneau		Quito, Equateur	

N°	Code	Nature	Type de pvt	Lieu de pvt	Remarque
	BU-63	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-93	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-105	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-110	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-114	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-117	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	BU-175	Cysticerque	Humain	Kayanza, Burundi	
	SIKAG	Cysticerque	Humain	Togo	Conservé dans formol
	GNYAO	Cysticerque	Humain	Togo	Conservé dans formol
	NAMAR	Cysticerque	Humain	Togo	Conservé dans formol
	ELYEV	Cysticerque	Humain	Togo	Conservé dans formol

ANNEXE 3 : Préparation des solutions utilisées par la technique d'IEF

Solution d'acrylamide à 29,1%

Acrylamide.....5,82 g

Eau distillée.....15 ml

Dissoudre sur agitateur magnétique

Filtrer sur nitrocellulose à 0,45 µm

Conserver à +4°C dans un flacon brun (15 jours maximum).

Solution bis-acrylamide à 0,9%

N,N'-Méthylène bis-acrylamide.....180 mg

Eau distillée.....20 ml

Dissoudre sur agitateur magnétique

Filtrer sur nitrocellulose 0,45 µm

Conserver à +4°C dans un flacon brun (15 jours maximum)

Persulfate d'ammonium à 10%

Persulfate d'ammonium.....500 mg

Eau distillée.....5 ml

1M Tris HCl pH 8 (Solution mère pour 0,2 M Tris HCl pH 8)

Tris.....12,1 g

Eau distillée.....80 ml

Ajuster le pH à 8 avec HCl

Compléter le volume à 100 ml avec de l'ED.

0,1 M Tris HCl pH 7,4

Tris.....1,21 g

Eau distillée qsp.....100 ml

Ajuster à pH 7,4 avec HCl (1N).

ac. Malique (2 M) pH 7 :

ac. Malique.....13,41 g

NaOH (paillettes).....8 g

Eau distillée qsp.....50 ml

Mettre l'acide malique dans un bécher en verre et mettre le tout dans un bac contenant de la glace pilée que l'on pose ensuite sur un agitateur magnétique.

Verser 20 ml d'eau sur l'acide malique.

Mélanger puis verser tout doucement le NaOH. (La solution ne doit ni se troubler ni s'échauffer)

Quand le NaOH est dissout, compléter le volume à 50 ml.

Ajuster le pH à 7 avec NaOH en paillettes

ANNEXE 4 : Préparation des gels pour IEF

• Préparation des gels d'acrylamide : PAG 3 - 10 / PAG 4 - 6,5

Acrylamide (29,1%).....	3,5 ml
Bis-acrylamide (0,9%).....	3,5 ml
Pharmalyte 3-10 ou 4-6,5.....	1,5 ml
Eau distillée.....	12 ml
On dégaze 5 à 10 min, puis on ajoute :	
Persulfate d'ammonium (APS) (1,5%).....	0,5 ml
TEMED.....	25 µl

Après avoir mélangé brièvement tout en évitant d'introduire des bulles d'air, couler immédiatement entre deux plaques de verres espacées de 5 mm à l'aide d'une seringue munie d'un petit tuyau.

Laisser le gel se polymériser à température ambiante pendant 30 min environ. Puis, le mettre dans une chambre humide, à 4°C, pendant au moins une heure.

• Préparation des gels d'agarose 3-10 / 4-6,5

Agarose pour IEF.....	0,3 g
Sorbitol.....	3,6 g
Eau distillée.....	27 ml
Chauffer jusqu'à ce que la solution devienne limpide.	
Laisser tiédir à 75°C, puis ajouter :	
Pharmalyte 3-10 ou 4-6,5.....	1,9 ml
Mélanger rapidement à l'aide d'un agitateur magnétique.	

Couler sur film GelBond® pour gel d'agarose préchauffé en répartissant le mélange sur toute la surface et en veillant à avoir une épaisseur de gel constante.

Laisser solidifier à température ambiante pendant 15 min au moins. Puis, mettre à 4°C dans une chambre humide pendant au moins une heure.

ANNEXE 5 : Conditions opératoires de l'IEF

• Conditions opératoires pour gels d'acrylamide

ANODE (+) : 1 M H_3PO_4 (1,4 ml H_3PO_4 dans 25 ml eau distillée)

CATHODE (-) : 1 M NaOH (1 g NaOH dans 25 ml eau distillée)

Voltage : 2000 V

Courant : 50 mA

Puissance : 25 W (constante)

Réfrigération : 6°C

Pré focalisation : 20 min

Durée totale : 1 heure 20 min.

• Conditions opératoires pour les gels d'agarose

ANODE (+) : 0,05 M H_2SO_4 (135 μl H_2SO_4 dans 50 ml eau distillée)

CATHODE (-) : 1 M NaOH (1 g NaOH dans 25 ml eau distillée)

Voltage : 1500 V

Courant : 50 mA

Puissance : 15 W (constante)

Réfrigération : 6°C

Pas de pré focalisation.

Durée : 1 heure 20 min.

Remarque : avant de commencer la focalisation, éponger le gel à l'aide d'un papier absorbant.

ANNEXE 6 : Solution de révélation des enzymes

• Phosphoglucomutase (PGM)

E C 2.7.5.1

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH8.....	10 ml
Mg Cl ₂ (0,5 M).....	1,5 ml
Glucose 1-phosphate*.....	150 mg
NAD (1%).....	0,5 ml
NADP (1%).....	0,25 ml

Au dernier moment :

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (250 unités/ml).....	10 µl
MTT (1%).....	0,5 ml
PMS (1%).....	0,25 ml
Agarose (2%).....	10 ml

Incuber à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

*Glucose 1-phosphate contient au moins 1% de glucose 1,6-diphosphate.

• Aldolase (ALD)

E C 4.1.2.13

D'après Harris & Hopkinson :

0,2 M Tris HCl pH 8.....	10 ml
Fructose 1,6-diphosphate, Na ₃ , 8H ₂ O.....	40 mg
NAD (1%).....	0,8 ml
Arsenate, Na.....	24 mg

Au dernier moment :

Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase (800 unités/ml).....	20 µl
MTT(1%).....	300 µl

PMS(1%).....100 µl

Agarose (2%).....10 ml

On incube à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

• **Adénylate kinase ou Myokinase (AK)** **E C 2.7.4.3**

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....15 ml

α-D(+)-Glucose.....100 mg

MgCl₂ (0,5 M).....1 ml

ADP.....30 mg

NAD (1%).....1 ml

NADP (1%).....0,5 ml

Au dernier moment :

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (250 unités/ml).....20 µl

Hexokinase (500 unités/ml).....20 µl

PMS (1%).....500 µl

MTT (1%).....500 µl

Agarose (2%).....10 ml

Incuber à 37°C et dans l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

• **Glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PDH)** **E C 1.1.1.49**

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....10 ml

D-Glucose 6-phosphate, Na₂.....20 mg

NADP (1%).....0,4 ml

MgCl₂ (0,5 M).....4 ml

Ajouter au dernier moment :

NBT (1%).....	0,2 ml
MTT (1%).....	0,2 ml
PMS (1%).....	0,6 ml

Incuber à l'obscurité et à 37°C jusqu'à l'apparition de tâches bleues.

● **Hexokinase (HK)**

E C 2.7.1.1

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....	10 ml
α-D(+)-Glucose.....	150 mg
ATP.....	25 mg
NAD (1%).....	0,3 ml
MgCl ₂ (0,5 M).....	0,2 ml
NADP (1%).....	0,15 ml

Au dernier moment :

Glucose 6-phosphate déshydrogénase (250 unités/ml).....	15 µl
MTT (1%).....	150 µl
PMS (1%).....	60 µl

Incuber à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

● **Lactate déshydrogénase (LDH)**

E C 1.1.1.27

0,1 M Tris HCl pH 7,4.....	25 ml
D,L-Lactate, Li.....	750 mg
NAD (1%).....	800 µl

Au dernier moment, ajouter :

NBT (1%).....	500 µl
PMS (1%).....	100 µl

Incuber à l'obscurité jusqu'à l'apparition de taches bleues.

● **Malic Enzyme (ME)**

E C 1.1.1.40

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....10 ml

MgCl₂ (0,5 M).....1,5 ml

ac. Malique (2 M) pH 7.....1 ml

NADP (1%).....100 µl

Au dernier moment :

PMS (1%).....0,1 ml

NBT (1%).....0,2 ml

MTT (1%).....0,2 ml

Incuber à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

● **Malate déshydrogénase (MLD)**

E C 1.1.1.37

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....10 ml

ac. Malique (2 M) pH 7.....1,5 ml

MgCl₂ (0,5 M).....0,1 ml

NAD (1%).....0,6 ml

Au dernier moment :

NBT (1%).....0,3 ml

PMS (1%).....0,15 ml

MTT (1%).....0,3 ml

Incuber à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

● **6-Phosphogluconate déshydrogénase (6-PGD)**

E C 1.1.1.43

D'après Pasteur :

0,2 M Tris HCl pH 8.....10 ml
MgCl₂ (0,5 M).....1,5 ml
ac 6-phosphogluconique, Na₃.....20 mg
NADP (1%).....0,1 ml

Au dernier moment :

PMS (1%).....0,1 ml
NBT (1%).....0,2 ml
MTT (1%).....0,2 ml

Incuber à 37°C et à l'obscurité jusqu'à l'apparition de bandes bleues.

ANNEXE 7 : Composition des solutions stocks utilisées en RAPD

• Protéinase K (10 mg/ml)

La protéinase K est reconstituée avec de l'eau distillée stérile (BIOSEDRA) et ajustée à la concentration de 10 mg/ml.

Conservation à -20°C en aliquots de 20 μl .

• PCR Buffer (10X) (fourni avec la Taq DNA Polymérase)

100 mM Tris HCl pH=9 à 25°C

500 mM KCl

15 mM MgCl_2

Conservation à -20°C .

• dNTP (1mM)

dATP (100mM).....10 μl

dCTP (100 mM).....10 μl

dGTP (100 mM).....10 μl

dTTP (100 mM).....10 μl

dH₂O.....960 μl

Conservation à -20°C en aliquots de 150 μl .

• Amorces (10 pmol/ μl)

Les amorces sont sous forme lyophilisée. Elles sont reconstituées avec du tampon Tris EDTA (TE) pH 8 et ajustées à la concentration de 10 pmol/ μl .

Conservation à -20°C en aliquots de 120 μl .

- **Solution de charge (10X)**

30% (w/v) Ficoll

200 mM EDTA, pH 8

0,5% (w/v) Bleu de Bromophéno

Eau distillée

Conservation à +4°C.

- **Solution de charge (6X) (Sigma G-7654)**

0,25% (w/v) Bleu de Bromophéno

0,25% (w/v) Xylène Cyanole FF

40% (w/v) sucrose

Eau distillée

Conservation à +4°C.

- **Tampon TBE (1X) :**

89 mM Tris

89 mM acide borique

2mM EDTA

pH 8,3

La solution TBE (1X) est obtenue par dilution au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée de la solution TBE (10X) (Bio Rad).

Conservation à +4°C.

ANNEXE 8 : Migration

• Préparation du gel_d'agarose

Agarose.....0,33g

Tampon TBE (1X).....33 ml

Chauffer pour faire fondre l'agarose. Laisser refroidir à 65°C, puis ajouter 1,65 µl de bromure d'éthidium à 10 mg/ml.

Bien mélanger, puis couler dans le cuve d'électrophorèse MINICELL® avec 12 ou 13 puits.

Laisser le gel se solidifier à température ambiante pendant 45 min.

• Conditions de migration

Pour la quantification de ADN extrait :

U = 75 Volts

Dépôt : ADN : 10 µl + 1 µl solution de charge (10X)

Solutions standards : 6 µl

Durée : 1 heure

Pour les produits d'amplification :

U = 50 Volts

Dépôt : ADN : 15 µl

Témoin de PM : 2 µl + 13 µl tampon TBE

Solution de charge (6X) : 3 µl

Durée : 2 h 45 min.

ANNEXE 9 : Préparation du MIX

- Pour N tubes, multiplier la quantité par tube par (N+1). Mettre les différents solutions dans un tube stérile.

- Bien mélanger ; puis centrifuger rapidement.

- Aliquoter en 49 µl.

Remarque : Les tubes contenant le MIX sont gardés dans de la glace pilée pendant toute l'opération.

AMPLIFICATION

- Appareil : Thermal cycler 480 (Applied Biosystems)

Programmation de l'amplificateur :

94°C pendant 5 min,

45 cycle de 94°C pendant 1 min, 36°C pendant 1 min, 72°C pendant 2 min,

72°C pendant 10 min.

Maintenir à 4°C jusqu'à l'arrêt de l'appareil

- Appareil : GeneAmp® PCR System 2700 (Perkin Elmer)

Programmation de l'amplificateur :

94°C pendant 5 min,

45 cycle de 94°C pendant 30 sec, 36°C pendant 30 sec, 72°C pendant 1 min,

72°C pendant 7 min.

Maintenir à 4°C jusqu'à l'arrêt de l'appareil.

Les produits d'amplification peuvent être conservés à 4°C si la migration se fait dans les 24 heures suivant l'amplification. Sinon, ils seront conservés à -20°C.

ANNEXE 10 : Réactifs et matériels utilisés en IEF

Acide ortho-phosphorique H_3PO_4 (Prolabo P.R Normapur, 20 624.295)

Acide sulfurique H_2SO_4

Acrylamide (Sigma, A-8887)

Agarose pour IEF (Amersham Biosciences, 17-0468-01)

Bind-Silane (Amersham Biosciences, 17-1330-01)

N,N'-Methylene bisacrylamide (Sigma, M-7256)

Broad pI calibration kit 3-10 (Amersham Biosciences, 17-0471-01)

Filtre de nitrate de cellulose à 0,45 μm (Sartorius, 11 306-25-N)

GelBond[®] Film for agarose 124 \times 258 mm (Amersham Biosciences, 80-1129-32)

GelBond[®] PAG film for polyacrylamide gel 124 \times 258 mm (Amersham Biosciences, 80-1129-36)

Glycérol (Prolabo Rectapur, 24 387.292)

Hydroxyde de sodium NaOH

IEF electrode strips (Amersham Biosciences, 18-1004-40)

Persulfate d'ammonium (Serva, 13 375)

Pharmalyte 3-10 (Amersham Biosciences, 17-0456-01)

Pharmalyte 4-6,5 (Amersham Biosciences, 17-0452-01)

ReadySol IEF 40% (Amersham Biosciences, 17-1310-01)

Repel-Silane ES (Amersham Biosciences, 17-1332-01)

D-Sorbitol (Sigma, S-1876)

TEMED = N,N,N',N'-Tetraméthyléthylènediamine (Sigma, T-9281)

Générateur : LKB 2197 (BROMMA)

Circuit de réfrigération : LKB 2219 Multitemp II Thermostatic circulator (BROMMA)

Cuve de migration : LKB 2117 Multiphor (BROMMA)

Plaque de verre 124 \times 258 mm

Plaque de verre 124 \times 238 mm

ANNEXE 11 : Réactifs et matériels utilisés en RAPD

Agarose standard (Eurobio, 18052)

Bleu de bromophénol (Sigma, B-5525)

Bromure d'éthidium à 10 mg/ml (Sigma, E-1510)

dATP (100 mM) (Quantum appligene, DATP01)

dCTP (100 mM) (Quantum appligene, DCTP01)

dGTP (100 mM) (Quantum appligene, DGTP01)

dTTP (100 mM) (Quantum appligene, DTTP01)

Ficoll (Sigma, F-2637)

Solution de charge (6X) (Sigma, G-7654)

Genomic PrepCells™ and Tissue DNA isolation kit (Amersham Biosciences, 27-5237-01)

MgCl₂ (1M) (Sigma, M-1028)

Tube Eppendorf 1,5 ml (Polylabo)

Piston Pellet autoclavable (Polylabo)

Microtubes 0,25 ml PCR stériles (Applied Biosystems,)

Primer (kit A et kit B) (Quantum appligene, RAF020)

Protéinase K (Sigma, P-2308)

Tampon TBE (10X) (Bio-Rad, 161 0733)

Taq DNA polymérase (5000 U/ml) (Amersham Biosciences, 27-0799-02)

Témoin de poids moléculaires – 100 bp ladder (Roche diagnostics, 1 721 933)

Témoin de poids moléculaires – 250 bp ladder (Roche diagnostics, 1 855 638)

Solutions standards pour la quantification d'ADN (Life technologies, 14420-012)

Thermal cycler 480 (Perkin Elmer)

GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems)

Centrifugeuse réfrigérée

Cuve d'électrophorèse MINICELL® EC 370 M

Générateur : LKB 2197 (BROMMA)

ANNEXE 12 : Liste de publications et communications

Publication 1 : **Druet-Cabanac M., Ramanankandrasana B., Bisser S., Dongmo L., Avodé G., Nzisabira L., Dumas M., Preux P.-M.** – *Tænia solium* cysticercosis in Africa. In : Singh G. and Prabhakar S. Eds. *Tænia solium* cysticercosis : from basic to clinical science. – New York : CAB International Publishing, 2002, p. 129-137.

Publication 2 : **Houinato D., Ramanankandrasana B., Adjidé C., Melaku Z., Josse R., Avodé G., Dumas M., Bouteille B.** – Seroprevalence of cysticercosis in Bénin. – *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1998, 92, p.621-624.

Publication 3 : **Houinato D., Ramanankandrasana B., Preux P.-M., Avodé G., Bouteille B.** – Identification of high prevalence areas for cysticercosis in Northern Benin using LQAS method. – en soumission.

Publication 4 : **Nsengiyumva G., Druet-Cabanac M., Ramanankandrasana B., Bouteille B., Nsizabira L., Preux P.-M.** – Cysticercosis as a major risk factor for epilepsy in Burundi, East africa. – *Epilepsia*, 2003, 44, 7, p. 950-955.

Publication 5 : **Waruingi M., Ramanankandrasana B., Druet-Cabanac M., Nsengiyumva G., Bouteille B., Preux P.-M.** – Kenya : a new human cysticercosis focus. – *African Journal of Neurological Sciences*, 2002, 21, p. 46.

Publication 6 : **Ramanankandrasana B., Tehindrazanavelo A., Andriantsimahavandy A., Preux P.-M., Dumas M., Bouteille B.** – Diagnosis of neurocysticercosis in Madagascar. Comparative study of six immunological methods. – en soumission.

Publication 7 : **Vega R., Pinero D., Ramanankandrasana B., Dumas M., Bouteille B., Fleury A., Sciutto E., Larralde C., Fragoso G.** – Population genetic structure of *Tænia solium* from Madagascar and Mexico : implications for clinical profile diversity and immunological technology. – *International Journal for Parasitology*, 2003, 33, p. 1479-1485.

Communication 1 : **Ramanankandrasana B., Tehindrazanavelo A., Preux P. M., Andriantsimahavandy A., rasamindrakotroka A., Chabrier J., Randriamahary – Ramialiharisoa A., Dumas M., Bouteille B.** – Valeur de la sérologie dans le diagnostic de la neurocysticercose. A propos d’une étude cas-témoins à Madagascar. – *Société Médicale du Limousin*, Limoges, 19 décembre 1997. (communication orale).

Communication 2 : **Ramanankandrasana B., Tehindrazanavelo A., Rasamindrakotroka A., Preux P. M., Andriantsimahavandy A., Chabrier J., Randriamahary – Ramialiharisoa A., Dumas M., Bouteille B.** – Valeur de la sérologie de la neurocysticercose. A propos d’une étude cas-témoins à Madagascar. – *Troisième Congrès de Neurologie Tropicale*, Fort-de-France (Martinique), 30 novembre-2 décembre 1998, (communication orale).

Communication 3 : **Druet-Cabanac M., Nsengiyumva G., Ramanankandrasana B., Nsizabira L., Bouteille B., Dumas M., Preux P.-M.** – Impact de la cysticercose dans la survenue de l’épilepsie à Kiremba, Burundi. – *Journées de Neurologie de Langue Française*, Tours (France), 2-6 avril 2002, (communication affichée).

Communication 4 : **Vega R., Ramanankandrasana B., Bouteille B., Dumas M., Dominguez J. L., Sciutto E., Fleury A., Fragoso G.** – Variabilidad genética de cisticercos de *Taenia solium* de México y Madagascar por medio de random amplified polymorphic DNA. – XV Congreso Nacional de Inmunología, Ixtapa Zihuatanejo (México), 28 avril-1^{er} mai 2002, (communication orale).