

UNIVERSITE DE LIMOGES

Ecole doctorale thématique Gay-Lussac (ED 523) Sciences pour l'environnement

Faculté de Médecine

Année 2010

Thèse N°

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Sciences-Santé

Spécialité : Parasitologie

Présentée et soutenue publiquement par

Lorraine MICHELET

Le 28 septembre 2010

Le complexe taeniase/cysticercose :
la phylogénie et l'évolution de *Taenia solium* et
la biologie moléculaire appliquée au diagnostic.

Jury :

Professeur Martin DANIS

Président

Professeur Edda SCIUTTO

Rapporteur

Professeur Pierre DORNY

Rapporteur

Docteur Catherine DAUGA

Examineur

Professeur Pierre-Marie PREUX

Examineur

Docteur Bernard BOUTEILLE

Directeur de thèse

A Toutounet

Les seules choses qui sont impossibles à finir sont celles que l'on ne commence pas.

Lynn Johnston

Remerciements

Merci au Professeur **Martin Danis** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse et m'avoir accueillie au sein du laboratoire de Parasitologie - Mycologie de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière pendant ces six dernières années. L'environnement scientifique et médical du laboratoire m'a permis d'élargir mes connaissances sur d'autres maladies infectieuses.

Merci au Professeur **Edda Sciutto** d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail de thèse et d'avoir fait le déplacement jusqu'à Limoges pour siéger dans mon jury pour la soutenance. Merci Edda pour l'opportunité que vous m'avez offerte de travailler dans le Département d'Immunologie de l'Instituto de Investigaciones Biomedicas de l'Universidad Nacional Autonoma de Mexico.

Merci au Professeur **Pierre Dorny** d'être rapporteur de mon travail de thèse et d'être venu à Limoges pour ma soutenance. Je vous remercie également pour les enseignements sur la cysticercose qui ont orienté mes recherches lors de mon séjour à l'Institut de Médecine Tropicale d'Anvers dans votre Département de Santé Animale.

Je souhaite également remercier chaleureusement le Docteur **Catherine Dauga** du Génopôle Ile-de-France de l'Institut Pasteur de Paris qui a pris part à mon projet de thèse et qui m'a soutenue tout au long de ce parcours. Merci pour ces heures passées à discuter du *Taenia* et de son évolution, des hommes et nos grandes théories sur l'arrivée des porcs à Madagascar. Merci d'avoir toujours répondu présente et de m'avoir enseigné ces techniques qui m'ont permis d'élargir mes compétences.

Merci au Professeur **Pierre-Marie Preux** de l'EA3174 « Neurologie Tropicale et Comparée » de l'Université de Limoges pour avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci d'avoir favorisé mon déplacement dans le laboratoire d'Edda grâce à une prise en charge par le projet franco-mexicain ECOS Nord-ANUIES.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, le Docteur **Bernard Bouteille** qui m'a suivie tout au long de ces années. Merci d'avoir répondu présent à toutes les étapes clefs de ma thèse. Merci pour votre accueil à Limoges au sein de l'équipe EA 3174, pour nos discussions et surtout pour vos conseils qui m'ont permis d'aboutir. Je vous remercie pour la liberté et la confiance que vous m'avez accordées afin de mener à bien ce travail.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, le Docteur **Frédéric Gay** pour m'avoir encadrée ou guidée à mes débuts. Merci de m'avoir enseigné une rigueur scientifique et de m'avoir poussée au delà de mes limites.

Merci au Professeur **Gilles Dreyfuss** pour la formation que j'ai reçue en Master 2 au sein de l'équipe EA 3174 et qui m'a permis de poursuivre ces recherches. Un grand merci également à toute l'équipe de Limoges qui a toujours été derrière moi avec des conseils avisés.

Un grand merci à **Gladys Fragoso** et **Agnès Fleury** qui m'ont accueillie à l'Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Ces deux mois passés dans votre laboratoire ont été des plus enrichissants. Je vous remercie de cette opportunité qui m'a permis de finaliser mes recherches, de travailler dans un environnement différent et surtout de découvrir de nouveaux aspects du *Taenia*.

Merci au Professeur **Dominique Mazier** de m'avoir accueillie dans l'unité INSERM U511 puis l'UMR_S 945 et dans le laboratoire de Parasitologie - Mycologie de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière.

Je voudrais également remercier **Denis Limonne** pour ses conseils avisés sur le western blot de la cysticercose. Merci pour votre participation au fonctionnement de cette thèse.

Je tiens à remercier le Docteur **Luc Paris** du Laboratoire de Parasitologie - Mycologie de l'hôpital de La Pitié-Salpêtrière pour sa contribution fructueuse pour le diagnostic biologique de la cysticercose.

Merci à **Eric Kendjo**, dernier arrivé mais qui a fait de mon nouveau bureau un havre de paix. Merci pour ta contribution à mon travail et pour ton aide précieuse pour les statistiques. Mais je te remercie surtout pour l'ambiance qui a animé ma dernière année de thèse.

Un grand merci tout particulier pour **Liliane Ciceron**. Lili, tu m'as connue gamine comme tu le dis si bien. Grâce à toi, ces six années à la Pitié m'ont semblé bien courtes. Merci pour ton amitié, ta patience, tes conseils, tes connaissances et toutes nos rigolades. Merci d'avoir fait de ce labo ma deuxième maison et de m'avoir intégrée à cette grande famille.

Je tiens également à remercier toutes les personnes du laboratoire de Parasitologie - Mycologie avec qui j'ai partagé de très bons moments. Un merci particulier pour le Docteur **Annick Datry, Jimmy, Jean-Pierre**. Merci aussi à tous les techniciens et en particulier à **Didier** (pour ton expérience sur la cysticercose), **Josiane, Gabriel** (pour ton art de la photographie). Merci à toutes les secrétaires. Merci aux collaborateurs du 5^{ème} pour leur soutien, même passager. Merci à **Marc Thellier, à Pierre Buffet, à Sylvestre, à Julianna, à Benoit et à Guillaume**.

Un petit clin d'œil au personnel de l'hôpital de jour pour ces moments de détente partagés le midi et pour ce fromage qui me fait encore saliver.

Merci à toute l'équipe de l'Institut Pasteur de Madagascar. Mon stage de M2 est à l'origine de ce projet, je remercie donc **Jean-François Carod, Antoine Talarmin et Marc Jouan** de m'avoir encouragée à poursuivre sur cette thématique. Merci à mes collègues du laboratoire pour m'avoir appris les bases et les ficelles du diagnostic : **Mahenintsoa, Bakola, Nono et Arsène**.

Merci au Professeur **Roger Moyou** qui m'a accueillie à Yaoundé et m'a permis de découvrir l'envers du décor des abattoirs camerounais. Les longues heures d'attente en valaient la peine.

Merci à tout le personnel de l'Instituto de Investigaciones Biomedicas et surtout aux étudiants, **Jacqueline, Rene, Ruben, Marisol, Hector, Marisela, Dunia et Berenice** qui ont fait de ce séjour un souvenir mémorable. Une pensée toute particulière pour **Gabi** qui m'a « adoptée » et intégrée à sa famille. Je te remercie pour tous ces moments que je n'oublierai jamais.

Je remercie tout particulièrement mes parents, mes grands-parents et ma sœur qui ont toujours été présents et ont toujours cru en moi. Merci à toute ma famille pour leur soutien tout au long de ces années.

A **Vincent et Séverine**, un grand merci à tous les deux pour votre présence au quotidien. Que ce soit pour décompresser ou pour me rassurer, vous étiez toujours au rendez-vous !

A **Charlotte**, la rigolote, ma partenaire de belote. Merci pour toutes ces soirées, journées et vacances que tu as passées à mes côtés. Même dans les moments les plus difficiles, j'ai toujours pu compter sur toi.

A la fine équipe, toujours au rendez-vous : **Couros, Hélène, Shayan, Martin, Thomas, Edouard, Carole, Manue et Virginie**.

A mes anciens compatriotes de Madagascar qui ont assisté à mes débuts de chercheuse à l'Institut Pasteur. Pour tous ces repas et week-end que nous avons partagés. De Tana à Paris, vous avez toujours été là. Merci à vous : **Marlène, Céline, Nico, Edouard et Vincent**.

Je veux finalement remercier toutes les personnes qui ont croisé mon chemin et qui, au fil d'une discussion, m'ont offert un moment pour partager ma passion. Alors merci à tous !

Mademoiselle Lorraine Michelet a bénéficié d'une allocation de recherche (N° 23240-2006) du **Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche**.

La mission au Mexique s'est effectuée dans le cadre d'un projet de recherche **ECOS Nord-ANUIES (M06-SO1)**.

Ce projet a également eu le soutien de **Sanofi-Aventis**. Je remercie **Robert Sebbag**, directeur du Département Accès aux médicaments, et **Mireille Cayreyre** pour leur soutien et l'intérêt porté à mes recherches.

Je remercie le **Rotary club** de Paris La Défense qui a également soutenu mon projet.

Merci à la société **LDBIO Diagnostics** pour sa contribution à ces recherches.

Listes de abréviations

Ac :	Anticorps
Ag :	Antigène
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
BEAST :	Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees
BSA :	Bovine serum albumin
CC :	Cysticerque
Cox1 :	sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase
Cytb :	Cytochrome b
DO :	Densité optique
EITB :	Enzyme linked immunoelectrotransfer blot
ELISA :	Enzyme linked immuno-sorbent assay
ESA :	Espace sous-arachnoïdien
ESS :	Effective sample size
FAO :	Food and agriculture organisation
GTR :	General time reversible
HD :	Hôte définitif
HI :	Hôte intermédiaire
HRP :	Horseradish peroxidase
IC :	Intervalle de confiance
IgG :	Immunoglobuline G
INNN :	Institut National de Neurologie et de Neurochirurgie
IPM :	Institut Pasteur de Madagascar
IPP :	Institut Pasteur de Paris
IRM :	Imagerie par résonance magnétique
ITFDE :	International task force for disease eradication
ITS :	Internal transcribed spacer
LCR :	Liquide céphalorachidien
LTT :	Lymphocyte transformation test
Ma :	Million d'années
MAPIA :	Multiantigen printing immunoassay

McMC :	Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo
MEGA :	Molecular evolutionary genetics analysis
ML :	Maximum likelihood
MRCA :	Most recent common ancestor
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NC :	Neurocysticercose
ND :	Non déterminé
NCBI :	National center for biotechnology information
NJ :	Neighbour joining
OMS :	Organisation mondiale de la santé
OR :	Odds ratio
PAUP :	Phylogenetic analysis using parsimony
Pb :	Paire de base
PBS :	Phosphate buffered saline
PCR :	Polymerase chain reaction
PDN :	Prednisone
PHYLIP :	Phylogeny inference package
RAPD :	Random Applied Polymorphic DNA
RPM :	Rotation par minute
RFLP :	Restriction fragment length polymorphism
SNC :	Système nerveux central
TDM :	Tomodensitométrie
TMB :	Tétra méthyl benzidine
UNAM :	Universidad nacional autonoma de Mexico
UPGMA :	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean
vs :	Versus

Sommaire

Résumé	11
Introduction.....	14
Etude bibliographique	17
Objectifs	35
Travail expérimental.....	37
Partie 1 Phylogénie et évolution de <i>Taenia solium</i>	38
Partie 2 Diagnostic de la neurocysticercose.....	102
Conclusion et Perspectives	134
Références bibliographiques.....	138
Annexes.....	155
Table des matières.....	172

Résumé

Résumé

Taenia solium est responsable de deux maladies distinctes chez l'homme : la taeniose et la cysticerose. Le complexe Taeniose/Cysticerose est depuis longtemps étudié du fait de l'impact du parasite sur les populations humaines et porcines.

Nous avons voulu étudier ce complexe du point de vue du système hôte-parasite (hôte intermédiaire, hôte définitif et parasite). L'objectif principal de ce travail est d'approfondir les connaissances de ce complexe afin d'aboutir à l'amélioration du diagnostic de la neurocysticerose.

Nous avons travaillé en premier lieu sur les variations génétiques de *Taenia solium* dans différents pays : Madagascar, Cameroun et Mexique. Nous avons confirmé l'existence de deux génotypes qui reflètent la biogéographie particulière de *T. solium*. Nous avons pu déterminer des signatures nucléotidiques particulières permettant leur distinction. Nous avons par la suite estimé les dates de divergences de ces groupes afin d'établir l'origine biogéographique du parasite, notamment à Madagascar. Les observations faites à partir de *T. solium* ont été corrélées avec des données historiques, génétiques et archéologiques. Nous avons ensuite élargi notre étude aux deux autres *Taenia* qui parasitent l'homme : *T. saginata* et *T. asiatica*. L'origine de ces parasites chez l'homme a été étudiée ainsi que les événements ayant conduit aux changements d'hôtes. Nous avons donc émis plusieurs hypothèses quant aux événements majeurs de diversification de ces parasites. Nous avons plus particulièrement étudié leur relation avec leurs hôtes et l'influence que ces derniers ont eue sur la situation actuelle de ces trois *Taenia*.

Le second aspect de ce travail porte sur le diagnostic de la neurocysticerose. Les recherches ont été effectuées sur une population mexicaine où la cysticerose est endémique. Nous avons comparé tous les tests biologiques disponibles actuellement : ELISA détection d'anticorps, ELISA détection d'antigène, EITB et PCR. Ces données ont été combinées avec les informations cliniques, épidémiologiques et d'imagerie. Nous avons déterminé les paramètres intrinsèques (spécificité et sensibilité) de chaque méthode ainsi que la concordance entre les différents tests. Nous avons également étudié l'effet de l'inflammation du LCR sur ces paramètres. Nous proposons au final d'incorporer la PCR comme outil diagnostique de la neurocysticerose en combinaison avec les autres tests.

Abstract

Taenia solium is responsible for two distinct diseases in humans: taeniasis and cysticercosis. The complex Taeniasis/Cysticercosis has long been investigated because of the impact of the parasite on the human and pig populations.

We wanted to study this complex from the angle of the host-parasite system (intermediate host, definitive host and parasite). The main objective of this work is to deepen knowledge of this complex to lead to improved diagnosis of neurocysticercosis.

We work primarily on the genetic variation of *Taenia solium* in different countries: Madagascar, Cameroon and Mexico. We have confirmed the existence of two genotypes that reflect the particular biogeography of *T. solium*. We have determined the specific nucleotide signatures allowing their distinction. We then have estimated the dates of divergence of these groups to establish the biogeographical origin of the parasite, particularly in Madagascar. The observations from *T. solium* were correlated with historical, genetic and archaeological data.

We then expanded our study to two other *Taenia* that infect humans: *T. saginata* and *T. asiatica*. The origin of these parasites in humans has been studied as well as the events leading to host's switching. We have issued several hypotheses about the major events of diversification of these parasites. Specifically, we examined their relationship with their hosts and the influence they had on the current status of these three *Taenia*.

The second aspect of this work focuses on the diagnosis of neurocysticercosis. The research was conducted on a Mexican population where cysticercosis is endemic. We compared all biological tests currently available: ELISA for the detection of antibodies, ELISA for the detection of antigen, EITB and PCR. These data were compared with clinical, epidemiologic and imaging information. We determined the intrinsic parameters (specificity and sensitivity) of each method and the correlation between the different tests. We have also studied the effect of CSF inflammation on test results.

We propose to incorporate the PCR as a diagnostic tool for neurocysticercosis in combination with other tests.

Introduction

Les ténias sont des vers plats ou cestodes appartenant aux plathelminthes. Leur cycle d'évolution comprend deux stades : larvaire et adulte. Les cysticerques (forme larvaire) sont présents chez l'hôte intermédiaire alors que l'hôte définitif héberge la forme adulte du parasite. Ces deux hôtes appartiennent à un système prédateur-proie.

Au sein du genre *Taenia*, trois espèces parasitent l'homme et font par conséquent l'objet de nombreuses études. *Taenia saginata* et *Taenia solium* sont connus depuis l'antiquité alors qu'une nouvelle espèce, *Taenia asiatica*, a récemment été décrite.

Taenia saginata, parasite du bœuf, est largement présent dans le monde. Sa fréquence varie selon les habitudes alimentaires et les carences de contrôles sanitaires. *Taenia solium*, parasite de l'homme et du porc, est endémique dans de nombreux pays en développement, où l'élevage et la consommation de porcs sont courants. Il a pratiquement disparu des pays développés du fait de l'industrialisation, de l'amélioration des méthodes d'élevage et des contrôles sanitaires. *Taenia asiatica*, comme l'indique son nom, a une aire de répartition limitée à l'Asie.

Ces parasites sont responsables de la taeniose chez l'homme. *Taenia solium* est également responsable de la cysticercose humaine. Cette maladie se produit lorsque l'homme ingère des œufs de *T. solium* présents sur des aliments ou dans de l'eau contaminée. Dans ce cas, il devient hôte intermédiaire à la place du porc et développe des cysticerques. Cette maladie est liée aux mauvaises conditions d'hygiène et au péril fécal. Sa prévalence est élevée en Amérique centrale et du Sud, en Asie, en Afrique et dans l'Océan Indien (Ile de La Réunion et Madagascar). Plusieurs cas ont également été rapportés aux Etats-Unis, au Canada et dans d'autres pays développés.

Ce complexe a fait l'objet de nombreuses études. Des études épidémiologiques permettent d'estimer l'impact du parasite sur les populations humaines et porcines. Elles servent également à étudier les facteurs ou comportements à risque.

De nombreuses études portent sur le diagnostic de ces maladies chez le porc, pour améliorer le dépistage des porcs infectés, et chez les hommes, pour améliorer la prise en charge des patients. Les recherches portent sur l'amélioration des outils déjà disponible ou sur la mise au point de nouvelles techniques.

La recherche de vaccin pour le porc s'est développée ces dernières années.

Le développement des méthodes de biologie moléculaire a contribué à l'étude de ces parasites. Des techniques ont été élaborées afin d'identifier des marqueurs spécifiques de chaque espèce. Les données obtenues ont permis d'élargir les connaissances et d'aborder la phylogénie de ces espèces. Le but de ces recherches de mieux appréhender l'évolution du parasite dans son environnement.

Ce complexe est considéré comme un problème de santé publique dans de nombreux pays en développement. Toutes ces études permettent d'améliorer nos connaissances sur ce parasite et ainsi d'élaborer des programmes de lutte adaptés.

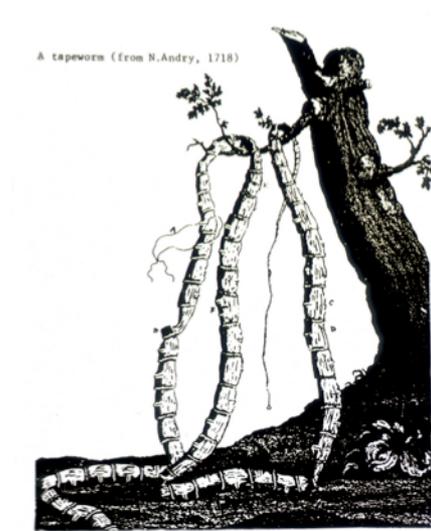
Etude bibliographique

I. L'histoire du *Taenia*

Dans l'Antiquité, Hippocrate (460-380 av. J-C) distinguait déjà trois sortes de vers parasites humains : les vers plats, les vers ronds et les « ascarides ». La première catégorie correspond aux cestodes (ténias), dont Hippocrate décrit la très grande longueur, l'expulsion par anneaux et également les segments remplis d'œufs. Dans son *Historia animalium*, Aristote (384-322 av. J-C) qui peut être considéré comme le fondateur de la parasitologie, est le premier à décrire la ladrerie ou cysticerose du porc, en particulier au niveau de la langue. Cette description fut reprise par Oribase (325-403) et par Albert le Grand dans son *De animalibus* (1193-1280). Un cas de cysticerose a été décrit chez une momie égyptienne qui a vécu pendant la période Ptolémaïque [305-30 av. J-C] (Bruschi et al., 2006).

C'est seulement en 1558 que fut décrite pour la première fois la cysticerose humaine par Rumler. L'italien Marcello Malpighi (1628-1694), fondateur de l'anatomie microscopique, fit une description du scolex des ténias (1681) et de la larve de *Taenia solium* en établissant clairement la relation entre les deux stades (1687). Le médecin zoologiste anglais Edward Tyson (1651-1708) reconnut le premier que l'extrémité antérieure des ténias se trouve dans la région amincie des vers. Il décrivit également le scolex et les crochets.

Nicolas Andry (1658-1742), médecin lyonnais et également parasitologue, publia un *Traité de la génération des vers dans le corps de l'homme*. Il divise les vers humains en 14 catégories selon leur localisation dans le corps. Le véritable fondateur de l'helminthologie est l'Allemand Karl Asmund Rudolphi (1771-1832). Il nomma le stade larvaire du *T. solium*, *Cysticercus cellulosae*, du fait de sa diffusion dans les tissus sous-cutanés. Il faut attendre le XIX^{ème} siècle pour que soit démontré expérimentalement que le cysticerque de porc est la forme larvaire du *T. solium* (Kuchenmeister) et le cysticerque de bœuf, la larve de *Taenia saginata* (Leuckart) (Nozais et al., 1996).



II. La place des *Taenia* parmi les *Taeniidae*

Les vers Taeniidés (Eucestode : Cyclophyllidae : Taeniidae) sont des parasites des mammifères, qui ont des carnivores pour hôtes définitifs et des herbivores comme hôtes intermédiaires. Pour le maintien de leur cycle, les vers Taeniidés ont besoin de ces 2 hôtes appartenant à un système « prédateur/proie » (Nakao et al., 2010). La famille des *Taeniidae* comprend 2 genres : *Taenia* et *Echinococcus*, qui ont un impact socio-économique causant une morbidité chez l'homme et les animaux domestiques (Hoberg, 2002). Le genre *Echinococcus* regroupe 4 espèces dont les hôtes définitifs sont les canidés et les hôtes intermédiaires sont les moutons ou d'autres herbivores. Ces parasites sont également responsables de l'hydatidose ou de l'échinococcose alvéolaire chez l'homme. Du fait de leur importance médicale et vétérinaire, les Taeniidés ont fait l'objet de nombreuses études épidémiologiques, écologiques et taxonomiques (Lavikainen et al., 2008).

Actuellement, 42 espèces sont reconnues au sein du genre *Taenia* (Nakao et al., 2010). Concernant les ténias qui parasitent l'homme, *T. saginata* et *T. asiatica* forment un groupe distant de *T. solium*.

Les études phylogénétiques nous informent sur les origines de la diversité des espèces, les associations avec les hôtes ainsi que sur la distribution géographique. Ces études sont également à la base des prédictions sur le comportement et la biologie des parasites. Une hypothèse sur la phylogénie de *Taenia* est basée sur l'analyse des caractères morphologiques du ver adulte et des métacestodes (Hoberg et al., 2000). D'après cette étude, les félidés seraient les hôtes définitifs ancestraux présumés des Taeniidés et les rongeurs leurs hôtes intermédiaires.

Il est important de résoudre les relations phylogénétiques et la taxonomie au sein de cette importante famille. La structure phylogénétique des espèces de *Taenia* a permis d'établir un scénario « out of Africa » lié à l'évolution de l'homme (Nakao et al., 2010). Le flux des gènes des populations de *T. solium* semble suivre les principales routes maritimes utilisées entre le XV^{ème} et le XIX^{ème} siècle (Martinez-Hernandez et al., 2009). Des études plus spécifiques des ténias de l'homme pourraient donc permettre une meilleure compréhension des migrations des populations humaines.

III. Le cycle

C'est au XVIII^{ème} siècle que furent nommés les deux plathelminthes du genre *Taenia* : *T. solium* par Linné en 1758 puis *T. saginata* par Goeze en 1782 (Nozais et al., 1996). *Taenia asiatica* a été décrit pour la première fois en 1992 (Eom et Rim, 1992).

Pour ces trois espèces de *Taenia*, l'hôte définitif (HD) unique est l'homme. L'hôte définitif est l'organisme qui porte la forme sexuée du parasite. Les hôtes intermédiaires (HI) permettent la dissémination du parasite et portent la forme larvaire. Les hôtes intermédiaires du *T. solium* sont le sanglier et le phacochère mais essentiellement le porc domestique. Pour *T. saginata*, les hôtes intermédiaires sont les bovidés et surtout les bovins domestiques. Les hôtes intermédiaires de *T. asiatica* sont également les porcs.

Cysticercus cellulosae, larve de *T. solium* s'évagine dans l'intestin grêle. Le scolex du parasite s'attache à la muqueuse et commence à former les segments ou proglottis. Le scolex de *T. solium* comporte 4 ventouses et une double rangée de crochets. Le ver est ensuite constitué d'un long strobile, mesurant 2 à 4 m, constitué de plusieurs centaines de proglottis. Deux mois après l'infection, les proglottis matures, également appelés gravides, se détachent de la partie distale du ver et sont excrétés dans les fèces. Chaque segment mature contient entre 50 et 60 000 œufs (Garcia et al., 2003).

Cysticercus bovis est la larve de *T. saginata* que l'on retrouve lors de l'infection du bœuf. La biologie du parasite est la même. L'homme s'infecte en ingérant de la viande de bœuf contaminée. Cependant, quelques différences morphologiques permettent de distinguer les vers adultes. *Taenia saginata* et *T. asiatica*, également appelés ténias inermes, ne présentent pas de crochets sur le scolex au contraire de *T. solium* ou ténia armé (Pawlowski et Schultz, 1972).

La longueur du ver peut également permettre la distinction, *T. saginata* étant en général plus long. Pour un diagnostic plus sûr, l'examen des proglottis après coloration montre un nombre de branches utérines différents selon les espèces : de 7 à 12 pour *T. solium*, de 18 à 32 pour *T. saginata* et de 16 à 21 pour *T. asiatica* (Pawlowski, 2002). L'examen parasitologique des selles permet rarement le diagnostic d'espèce. En effet, il est rare de retrouver le scolex ou des proglottis matures après un traitement antiparasitaire (Pawlowski, 2002).

Les anneaux de *T. saginata* et *T. asiatica* sont mobiles au contraire de ceux de *T. solium*. Les œufs contenus dans ces anneaux résistent longtemps à l'eau mais pas à la sécheresse. Ils sont difficilement distinguables. L'hôte intermédiaire ingère les œufs qui éclosent dans l'estomac ou l'intestin grêle, libérant l'embryon hexacanthé ou oncosphère (Figure 1) (Hawk et al., 2005). Un système enzymatique du parasite est activé par les acides et enzymes de l'estomac. L'embryon hexacanthé pénètre alors la muqueuse intestinale et se propage par voie sanguine.

Les larves cysticerques ou métacestodes de *T. saginata* se localisent alors dans les muscles striés des bovins, celles de *T. asiatica* strictement dans le foie des porcs (*Cysticercus viscerotropica*). Les larves cysticerques de *T. solium* se localisent, quant à elles, dans les muscles striés des porcs mais aussi dans la langue, l'œil et le cerveau (Nozais et al., 1996). Les métacestodes de *T. solium* présentent des crochets au contraire de ceux de *T. saginata*. Des crochets rudimentaires sont observés sur les larves de *T. asiatica*. La survie des cysticerques dans leur hôte est limitée à quelques années. Les cysticerques commencent alors à dégénérer, à se nécroser et finalement à se calcifier (Pawlowski, 2002). La longévité des cysticerques de *T. saginata* semble dépendre de la localisation tissulaire ainsi que de l'animal (Pawlowski et Schultz, 1972).

Avec *T. solium*, il peut arriver que l'homme devienne hôte intermédiaire, on se trouve alors dans le cas d'une impasse parasitaire. La cysticercose humaine est une maladie liée au péril fécal, causée par l'ingestion d'œufs de *T. solium*. L'homme est alors porteur de la forme larvaire, *Cysticercus cellulosae*, de *T. solium*.

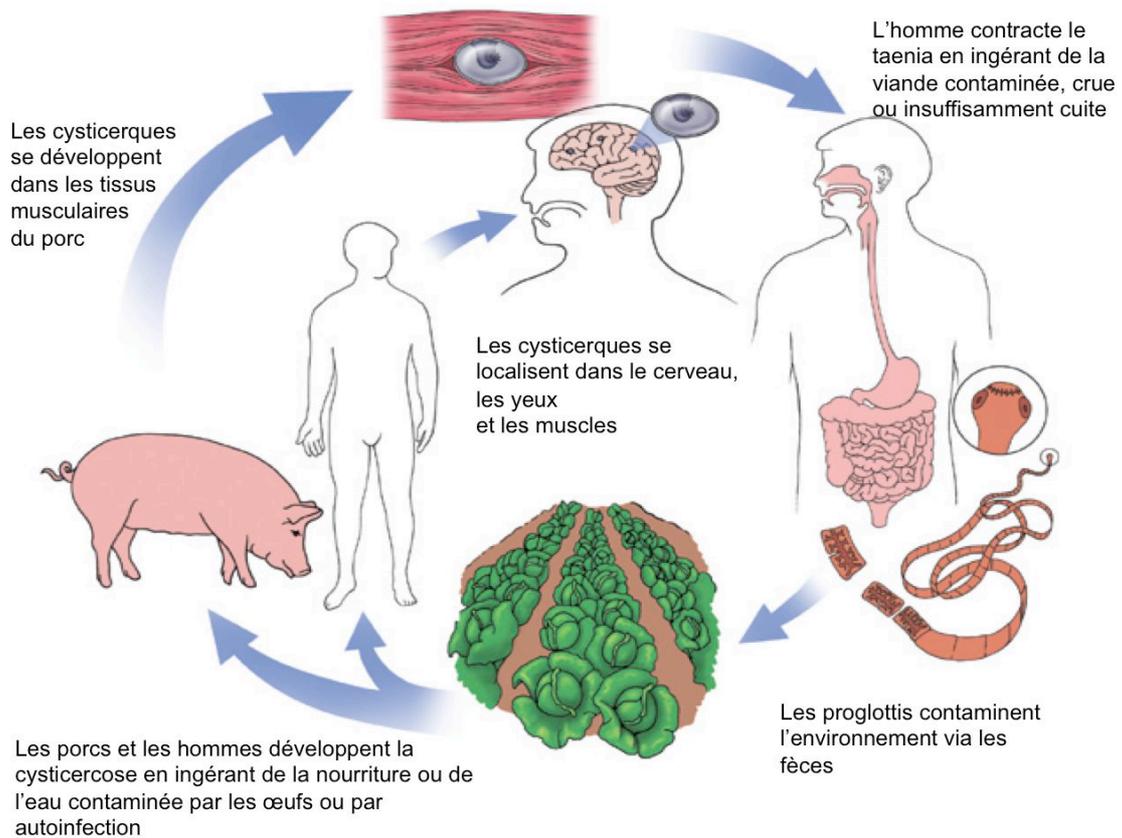


Figure 1 : Cycle de *Taenia solium* (adapté de l'illustration de Renee Cannon, (Kraft, 2007))

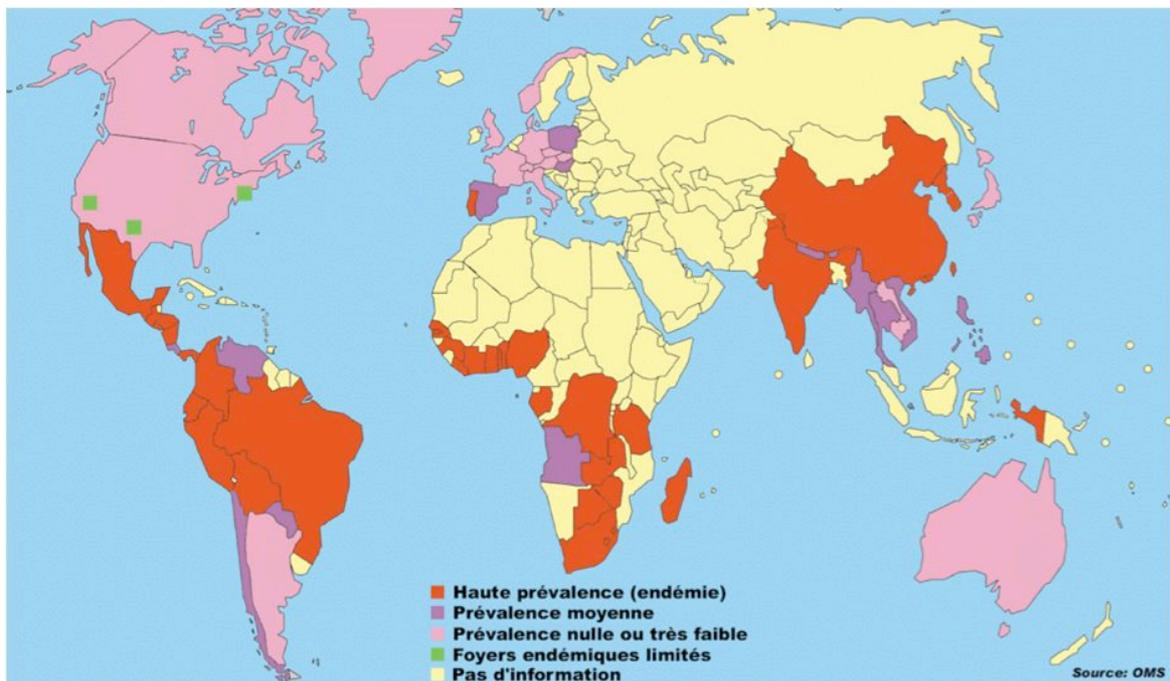


Figure 2 : Carte de la répartition mondiale de la cysticerose (Donnée de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS))

IV. L'épidémiologie

Taenia solium est un parasite cosmopolite (Figure 2). La transmission est liée aux conditions d'hygiène défectueuses. Sa fréquence est encore mal estimée.

Taenia saginata a également une répartition mondiale. On le retrouve encore en Europe où *T. solium* a quasiment disparu (Schantz, 2002). La prévalence de la cysticerose bovine en Europe varie de 0,007 à 6,8 % tandis que le taux de prévalence de la taeniose causée par *T. saginata* varie de 0,01 à 10 % selon les pays (Dorny et Praet, 2007). Les taux les plus élevés ont été observés en Slovaquie et en Turquie (Cabaret et al., 2002). *Taenia asiatica* est quant à lui une espèce endémique d'Asie du Sud-Est. Sa répartition géographique s'étend en Corée, en Chine, au Vietnam, en Thaïlande, en Malaisie, en Indonésie, en Papouasie Nouvelle Guinée, aux Philippines et à Taiwan (Eom et al., 2009). En Corée, un ratio de 1 : 5 a été trouvé entre les vers à scolex armé (*T. solium*) et inerme (*T. saginata* et *T. asiatica*). Le ratio entre les consommateurs de porc et de bœuf est de 5 : 1. La présence de *T. asiatica* dans ces zones permet d'expliquer la situation épidémiologique en Asie (Eom et Rim, 2001). La consommation de viscères de porcs est un facteur essentiel à la dissémination de *T. asiatica*.

Taenia solium est retrouvé en Amérique Latine, en Asie, en Afrique noire et dans l'Océan Indien, notamment à Madagascar et à l'île de La Réunion. A l'heure actuelle, on considère que 2,5 millions de personnes sont porteuses du ver adulte, 20 millions porteuses des larves cysticerques et que la cysticerose serait responsable de 50 000 décès par an, sous réserve de la fiabilité de ces données (Bern et al., 1999 ; ITFDE, 1993 ; Roman et al., 2000). Les porteurs de *Taenia* jouent un rôle majeur dans la dissémination du parasite dans leur environnement. La contamination initiale des porteurs est due à l'ingestion de viande de porc ladre crue ou insuffisamment cuite. La transmission de *T. solium* requiert que les porcs aient accès aux fèces humains. De telles conditions sont fréquentes dans les zones rurales de pays endémiques. Les facteurs favorisant la dissémination sont donc l'absence d'hygiène fécale, des conditions d'élevage des porcs précaires et la consommation de viande de porc mal cuite. C'est pourquoi la cysticerose est pratiquement absente dans les pays à tradition musulmane. Plus récemment, des cas importés ont été observés dans les pays industrialisés. Des touristes ou migrants revenant de voyage peuvent contaminer leur environnement s'ils sont porteurs du ver adulte.

Cette maladie est un problème connu de longue date en Amérique Latine (Pawlowski et al., 2005). Des études de séroprévalence humaine ont été réalisées dans de nombreux pays : Colombie (1,8 - 2,2 %), Brésil (3,0 - 5,6 %), Mexique (1,3 - 10 %), Pérou (7,1 - 26,9 %), Honduras (15,6 - 17 %), Equateur (2,6 - 14,3 %), Guatemala (10 - 17 %), Bolivie (22 %), Venezuela (4 - 36,5 %) (Pawlowski et al., 2005). La séroprévalence moyenne dans ces régions est de 10 %. Le taux de neurocysticercose (NC) varie de 1 à 22 % d'après les données basées sur les examens tomodensitométriques (TDM) et l'imagerie par résonance magnétique (IRM), avec un taux moyen de 7 %. Le taux de prévalence de la cysticercose porcine varie de moins de 2 % à plus de 75 % dans certaines régions. Les études réalisées au Guatemala, Honduras, Mexique et Pérou montrent les taux les plus élevés.

En Afrique de l'Est et du Sud, le complexe Taeniase/Cysticercose est un problème émergent, principalement lié à l'augmentation de la production de porcs au Kenya, en Ouganda, en Zambie et au Zimbabwe (Mafojane et al., 2003 ; Phiri et al., 2003). Le taux de cysticercose porcine a été estimé à environ 10 %. D'autres études rapportent que la neurocysticercose et l'épilepsie sont des problèmes de santé publique au Burundi, au Cameroun et au Congo (Zoli et al., 2003b).

La majorité des données d'Asie est disponible en chinois. L'évaluation de la prévalence de *T. solium* est difficile à estimer du fait de la présence simultanée de *T. saginata* et *T. asiatica*. Néanmoins, *T. solium* est présent dans les pays les plus peuplés tels que l'Indonésie, la Chine, l'Inde et le Vietnam (Rajshekhar et al., 2003 ; Simanjuntak, 1997). L'infection par *T. solium* est moins commune aux Philippines, en Thaïlande, en Malaisie, au Bangladesh et en Corée du Sud. La maladie est rare dans la péninsule arabique, en Afghanistan, en Iraq, en Iran et au Pakistan (Pawlowski et al., 2005).

Quelques cas ont été rapportés dans les pays développés, en majorité dus à l'immigration provenant des pays endémiques (Burneo et al., 2009 ; DeGiorgio et al., 2005 ; del la Garza et al., 2005). Plusieurs cas ont été décrits dans une communauté juive orthodoxe de New York. Le taux de séroprévalence a été estimé à 1,3 %, valeur étonnamment élevée pour une communauté dont la religion interdit la consommation de porc (Moore et al., 1995). Leurs employés récemment immigrés d'Amérique Latine ont été identifiés comme la source de l'infection (Schantz et al., 1992).

Nous avons travaillé plus particulièrement dans 3 pays de forte endémie qui présentent des situations épidémiologiques différentes.

1. A Madagascar

Les premiers cas furent décrits au début du XX^{ème} siècle (Andrianjafy, 1910 ; Monnier et Andrianjafy, 1910). Des études séroépidémiologiques ont été réalisées dans plusieurs régions de l'île. La séroprévalence de la cysticercose active a été évaluée entre 7 et 21 %. Les valeurs sont inférieures à 10 % dans les régions côtières (Mahajanga et Toamasina) et plus élevées dans les régions centrales de l'île (Antananarivo, Fianarantsao) où l'élevage de porc est plus important (Andriantsimahavandy et al., 2003). Lors d'une enquête séroépidémiologique réalisée dans le port de Mahajanga en 1999, la prévalence de la cysticercose a été estimée à 19 % (Migliani, 2000). La cysticercose a été identifiée comme un facteur de risque pour l'épilepsie (Andriantsimahavandy et al., 1997).

2. Au Cameroun

Les premiers cas de cysticercose humaine furent décrits dans la province Ouest en 1985 (Marty et al., 1985). Le Cameroun fait partie des pays d'Afrique centrale où le complexe *Taeniase/Cysticercose* a largement été étudié chez l'homme et le porc. Dans la province Ouest du Cameroun, la cysticercose humaine a été évaluée entre 0,7 et 2,4 % (Nguekam et al., 2003). Une étude chez des patients épileptiques a révélé un taux de prévalence élevé (44,6 %) basé sur une étude sérologique (Zoli et al., 2003a). La prévalence de la cysticercose porcine a été mesurée à 6,1 % par l'inspection des langues mais à 21,8 % et 11,0 % par les tests ELISA pour la détection d'anticorps (Ac) et d'antigènes (Ag) respectivement (Pouedet et al., 2002).

3. Au Mexique

De nombreuses études épidémiologiques ont été réalisées au Mexique. Le taux de prévalence de la cysticercose humaine varie de 3,7 à 12,2 % selon les régions. La cysticercose porcine a, quant à elle, été mesurée entre 1,0 et 35 % (Flisser et al., 2003).

Une étude sur la distribution spatiale de la cysticercose porcine a été réalisée dans 13 villages de la région centrale du Mexique. La prévalence de la maladie varie de 0 à 33,3 % et la transmission semble toujours active dans les régions rurales du Mexique (Morales et al., 2008b). La contamination du sol des maisons par les œufs de *Taenia* a également été étudiée dans la région de Puebla. Le plus grand nombre d'œufs a été retrouvé sur le sol des cuisines et au printemps (Huerta et al., 2008). La contamination fécale représente encore un risque dans les communautés rurales.

V. Le contrôle et la vaccination

La cysticerose a été considérée comme une maladie éradicable en 1993 (ITFDE, 1993). Elle a d'ailleurs presque disparu des pays industrialisés. L'éradication totale de la maladie, quoique théoriquement réalisable, a été remplacée par une volonté de contrôle et de réduction de la cysticerose (Pawlowski et al., 2005).

De nombreuses interventions sont possibles à chaque étape du cycle (Figure 3). La priorité semble être l'identification et l'élimination du ver adulte chez les porteurs de *Taenia* (unique réservoir), ce qui permettrait la prévention de la dispersion de la cysticerose chez les porcs et les hommes (Pawlowski, 2008). L'éducation sanitaire permettrait de protéger les porcs contre l'infection en améliorant les méthodes d'élevage et en limitant l'accès aux fèces humains (Sarti et al., 1997) ou de changer les modes de préparation de la viande de porc.

Le traitement de masse avec des antihelminthiques (praziquantel ou niclosamide) permet d'éliminer les vers adultes. Cependant l'infection chez le porc et par conséquent la transmission porc-homme, subsiste à ce type d'action. Le contrôle vétérinaire est la première action pour limiter cette transmission. La vaccination des porcs est une autre possibilité (Gonzalez et al., 2005). Des antigènes recombinants ont été développés pour la prévention de la cysticerose causée par *T. saginata*, *T. ovis*, *T. solium*, ainsi que pour l'hydatidose causée par *Echinococcus granulosus* (Lightowlers et al., 2003). L'antigène TSOL18 a permis d'obtenir plus de 99 % de protection dans 5 essais de vaccination contre *T. solium* (Lightowlers, 2006). La vaccination avec le recombinant Phage-S3Pvac réduit de 87 % le nombre de cysticerques (Morales et al., 2008a).

Plusieurs organismes travaillent actuellement sur la mise en place de programmes de lutte et de contrôle : le « Peru Cysticercosis Working Group » (Gonzalez et al., 2006), le « Cysticercosis Working Group in Eastern and Southern Africa » (Krecek, 2005), un « network for taeniasis/cysticercosis and echinococcosis in Asia and the Pacific Region » (Ito et al., 2004) et plus récemment le « Cysticercosis Working Group in Europe » (Willingham et al., 2008). Ces programmes doivent être une action conjointe entre médecins, vétérinaires et biologistes. Ils doivent avoir le soutien politique des pays touchés ainsi que celui de structures internationales telles que l'OMS ou la FAO (Engels et al., 2003). Et surtout, ils doivent combiner plusieurs actions : traitement de masse, contrôle vétérinaire, campagne de vaccination, éducation... (Flisser et al., 2006)

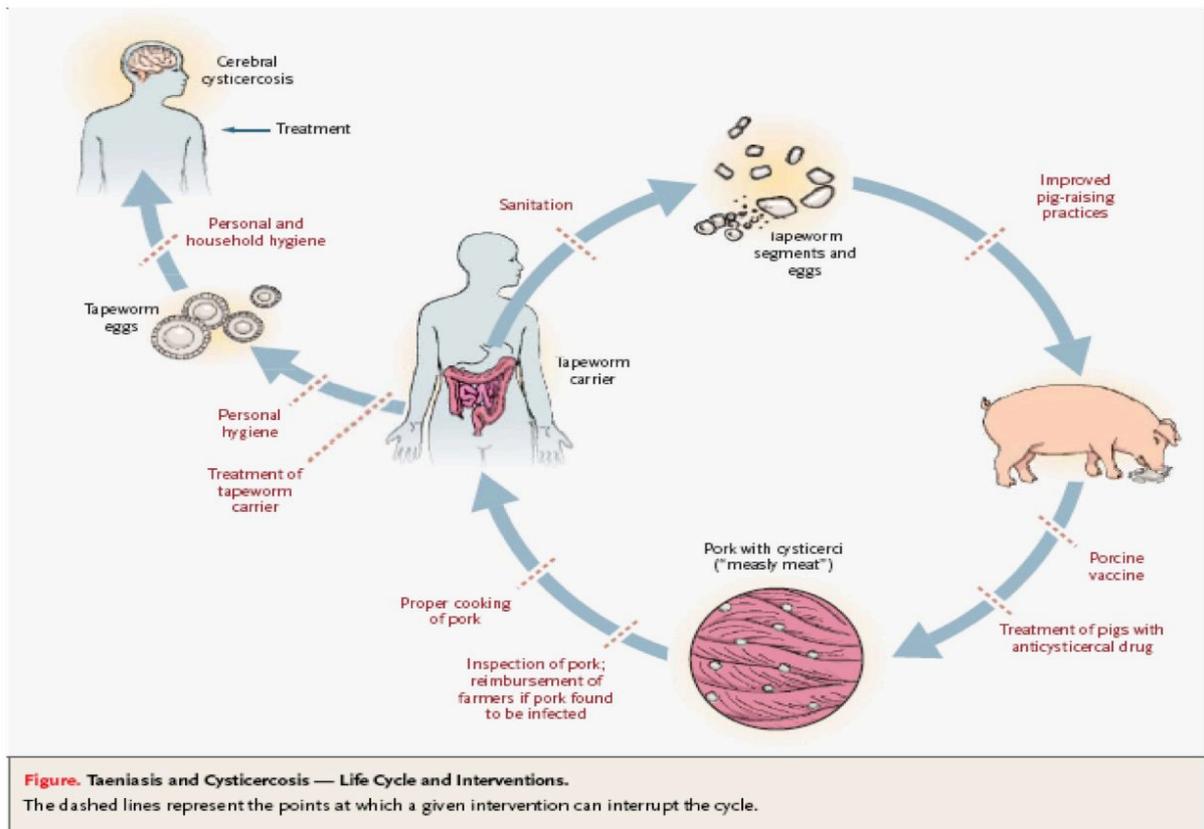


Figure 3 : Taeniasis et Cysticercose ; cycle et interventions (Maguire, 2004)

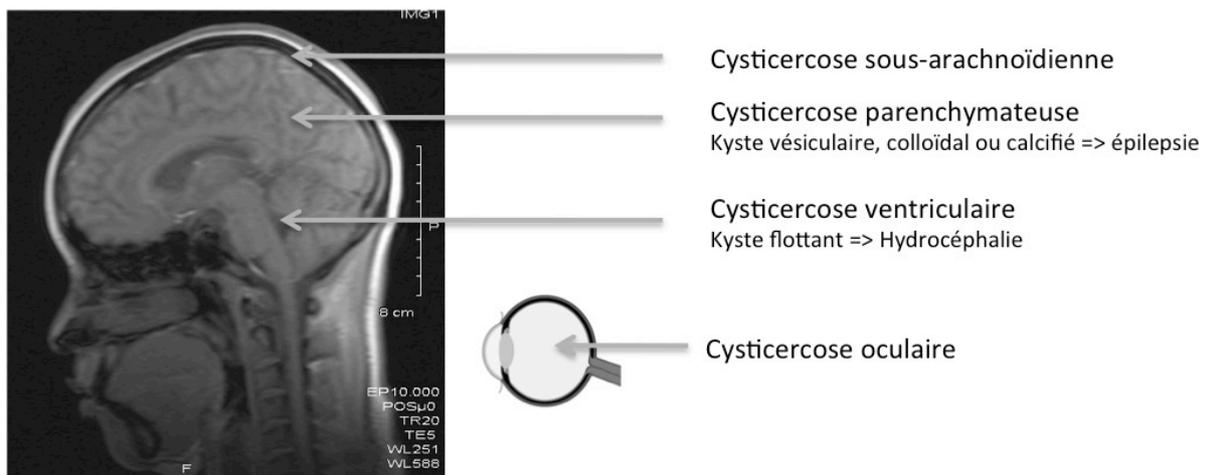


Figure 4 : Distribution tissulaire préférentielle des cysticercs de *Taenia solium* (IRM d'un patient du service de Neurologie de la Pitié-Salpêtrière).

VI. La taeniose et la cysticercose

Taenia solium est à l'origine de deux maladies qui touchent les hommes et les porcs. La taeniose est une maladie strictement humaine tandis que la cysticercose peut toucher les deux espèces. La clinique, les outils diagnostiques ainsi que les traitements sont spécifiques de la maladie et de l'hôte.

1. La taeniose : clinique, diagnostic et traitement

L'infection par le stade adulte de *T. solium* est généralement asymptomatique mais peut se caractériser par des symptômes bénins (Garcia et al., 2003). Des douleurs abdominales, diarrhées et nausées ont été attribuées à la taeniose mais aucune association n'a été prouvée. La majorité des patients ne présente aucun symptôme.

Le diagnostic d'une infection par *T. solium* est limité par la faible sensibilité de l'examen coprologique ainsi que par la ressemblance avec les œufs de *T. saginata*. Quand il est présent, le scolex avec ses deux rangées de crochets permet une identification du parasite. Le meilleur test biologique actuellement disponible est la détection d'antigènes coprologiques par ELISA (Allan et al., 1990). Les coproantigènes présentent plusieurs caractéristiques : ils sont spécifiques du genre *Taenia* mais ne permettent pas l'identification de l'espèce, le taux d'antigènes est indépendant de la présence ou du nombre d'œufs dans les fèces, ils ne sont plus détectables une semaine après la prise d'un traitement et ils sont très stables mais se conservent mal dans l'éthanol (Allan et al., 2003). Des techniques de détection d'ADN (acide désoxyribonucléique) ont été décrites ultérieurement permettant de distinguer les différentes espèces de *Taenia* (Gonzalez et al., 2000).

Deux médicaments sont disponibles pour traiter ces infections : le niclosamide et le praziquantel (Pawlowski, 2006). Le dosage est de 2 g en une prise pour le niclosamide et de 5-10 mg/kg en une prise pour le praziquantel.

2. La cysticercose humaine : clinique, diagnostic et traitement

Les manifestations cliniques de la cysticercose sont très variables tant en type qu'en sévérité. La période entre l'infection initiale et l'apparition des symptômes peut également varier. L'expression clinique de la cysticercose n'est pas spécifique et dépend généralement du nombre, de la taille et de la localisation des kystes ainsi que de la réponse immunitaire de l'hôte au parasite (Andriantsimahavandy et al., 2003). Les localisations préférentielles sont le système nerveux central (SNC), les muscles, les tissus sous-cutanés et les yeux. Les formes sous-cutanées et musculaires sont souvent asymptomatiques.

La neurocysticercose est le résultat de l'infestation par la larve de *T. solium* du SNC de l'hôte. On retrouve des cysticerques dans le parenchyme cérébral, l'espace sous-arachnoïdien (ESA), les ventricules avec parfois des formes racémeuses (Figure 4) (Esterre et al., 1994). L'hétérogénéité des symptômes de la neurocysticercose est fortement associée avec la variabilité de nombre, stade ou localisation des lésions parasitaires (Fleury et al., 2004).

Les manifestations cliniques les plus fréquentes de la neurocysticercose sont les crises d'épilepsie, une hypertension intracrânienne, des déficits neurologiques (déficits sensoriels, mouvements involontaires) et parfois des manifestations psychiatriques (dépression, épisodes psychotiques) (Sciutto et al., 2000 ; Takayanagui et Odashima, 2006). La neurocysticercose serait responsable de plus de 50% des crises d'épilepsie à début tardif dans les pays en développement (Del Brutto, 2005 ; Garcia et al., 2005). L'apparition des crises peut se produire entre 2 et 8 ans après l'infection (Pal et al., 2000). En général, on considère que l'apparition des symptômes se produit au moment de la dégénérescence ou de la mort du parasite quand il ne peut plus moduler la réponse immunitaire de l'hôte (White et al., 1997). Cependant, une étude a également montré que la présence seule d'un cysticerque vésiculaire peut être un facteur important dans la survenue de l'épilepsie (Del Brutto et al., 1992).

Certains auteurs ont établi une classification de la neurocysticercose en trois catégories : active quand le parasite est vivant, transitionnelle pendant la phase dégénérative et inactive quand le parasite est mort (Carpio et al., 1994).

Le diagnostic de la cysticerose est rendu difficile par l'absence de signes pathognomoniques (Del Brutto et al., 1996 ; Rajaonarison et al., 2001). Une grande proportion des personnes atteintes de neurocysticerose est asymptomatique. L'apparition des symptômes peut également survenir de nombreuses années après l'infection (Willingham et Engels, 2006).

Des critères de diagnostic pour la cysticerose ont été déterminés. Ils sont basés sur l'exposition, la présentation clinique, la biopsie de cysticerques sous-cutanés (si présents), les études d'imagerie et les tests sérologiques (Del Brutto et al., 1996).

Cette charte décrit quatre types de critères : absolu, majeur, mineur et épidémiologique. Ces critères permettent de déterminer plusieurs degrés de certitude de diagnostic : définitif, probable ou possible. Le diagnostic de la cysticerose résulte donc, le plus souvent, d'un faisceau d'arguments.

2.1 Biopsie

Les nodules sous-cutanés sont rares en Amérique latine, plus fréquents en Afrique et très répandus en Asie. Ce sont de petits nodules indolores souvent localisés sur les bras, le dos ou la poitrine. L'examen anatomopathologique de la biopsie permet de diagnostiquer la maladie.

2.2 Imagerie

La tomодensitométrie (TDM) ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont les deux techniques de choix. Ces deux techniques permettent d'identifier les cysticerques dans le cerveau mais également d'informer sur l'intensité de l'infection, la localisation des kystes et le stade des lésions (Willingham et Engels, 2006). La TDM a une sensibilité et une spécificité de plus de 95% pour le diagnostic de la neurocysticerose. Cette technique est plus adaptée pour la détection des kystes calcifiés (Mervis et Lotz, 1980) tandis que l'IRM permet d'établir la localisation et le stade des kystes avec plus de précision (Suss et al., 1986).

Les localisations préférentielles des kystes dans le cerveau sont extra-parenchymateuses, espace sous-arachnoïdien et ventricule (V4), ou parenchymateuses. Certaines formes racémeuses ont été observées (Nash, 2003).

L'imagerie varie selon le stade de développement du parasite. Lors du stade vésiculaire précoce, le kyste apparaît avec une surface lisse et fine. Les œdèmes et la prise de contraste sont rares à ce stade mais présents lors de la dégénérescence du kyste. Le liquide intra-vésiculaire est alors hyper-intense par rapport au liquide céphalorachidien (LCR). Les kystes calcifiés ne montrent aucun effet de masse et aucune prise de contraste n'est visible (Osborn et Preece, 2006).

Les diagnostics différentiels pour la neurocysticercose à l'imagerie incluent les abcès, la tuberculose et d'autres infections parasitaires.

2.3 Tests immunologiques

Ces tests sont les plus couramment utilisés. Ils permettent de détecter les anticorps produits contre le parasite ou les antigènes du parasite lui-même. Deux tests sont disponibles : enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) et enzyme linked immunotransfer blot (EITB). De nombreuses méthodes ont été décrites (Deckers et Dorny, 2010). Le test de détection de l'antigène HP10 permet également le suivi des patients avec une neurocysticercose sévère (Fleury et al., 2007).

Une équipe indienne a développé un autre test immunologique : Lymphocyte transformation test (LTT). Ce test est basé sur l'incorporation de ³H-thymidine pour mesurer la prolifération des cellules lymphocytaires stimulées par les antigènes parasitaires (Prasad et al., 2008).

Récemment, un nouveau test « multiantigen printing immunoassay » (MAPIA) a été développé permettant de comparer la performance de différents antigènes recombinants de *T. solium* (Handali et al., 2010). Cette technique peut être utilisée pour des études épidémiologiques et peut déterminer la séroprévalence de la cysticercose et de la taeniose.

Les mesures thérapeutiques pour cette maladie comportent des traitements antiparasitaires, la chirurgie et le traitement des symptômes.

Le praziquantel et l'albendazole sont les deux produits antiparasitaires efficaces contre les cysticerques de *T. solium*. Le dosage habituellement préconisé pour le praziquantel est de 50 mg/kg/j pendant 2 semaines (Sotelo et al., 1988). Un dosage faible de 5 à 10 mg/kg/j a également un effet sur les cysticerques et des doses de 50 à 75 mg/kg/j sont bien tolérées (Garcia et al., 2002). Avec l'albendazole, le dosage habituellement utilisé dans le traitement de l'hydatidose (15 mg/kg/j) est utilisé pour la cysticercose (Escobedo et al., 1987). La durée du traitement a été réduite d'un mois à une semaine (Sotelo et al., 1990). Entre 60 et 85% des cysticerques localisés dans le parenchyme sont tués après un traitement standard. L'albendazole présente un effet parasiticide plus important que le praziquantel.

Entre le 2^{ème} et le 5^{ème} jour de traitement, des symptômes neurologiques peuvent apparaître et sont souvent attribués à une inflammation locale causée par la mort de la larve. Le traitement antiparasitaire est donc généralement couplé à des stéroïdes (dexaméthasone entre 4,5 et 12 mg/j ou prednisone à 1 mg/kg/j) afin de contrôler l'œdème et l'hypertension intracrânienne (Garcia et al., 2002).

L'albendazole a une meilleure pénétration dans le LCR, les concentrations ne sont pas influencées par la combinaison avec les stéroïdes et son coût est moins élevé que celui du praziquantel (Jung et al., 1990).

Le traitement chirurgical joue encore un rôle important dans certains cas de neurocysticercose. La neuro-endoscopie est la méthode qui présente le taux de succès le plus élevé par rapport aux dérivations ou autres approches neuro-chirurgicales (Rangel-Castilla et al., 2009).

Des recommandations ont été proposées par un groupe d'experts (Garcia et al., 2002) en fonction de la localisation et du stade du parasite. Ce consensus doit être adapté à chaque patient.

3. La cysticerose porcine : clinique, diagnostic et traitement

L'infection chez le porc apparaît bénigne étant donné l'absence de symptômes manifestes. Cependant, certains symptômes ont été identifiés comme indicateur d'une atteinte cérébrale chez le porc : une salivation excessive, des clignements d'yeux plus fréquents, un excès de larmes et des nodules sous-conjonctivaux (Prasad et al., 2006).

La détection de la cysticerose porcine est importante pour déterminer la situation endémique d'une région. Le contrôle peut se faire sur l'animal vivant : examen de la langue et test sérologique ou lors de l'abattage avec l'inspection de la carcasse (Willingham et Engels, 2006).

3.1 Examen de la langue

Dans les pays endémiques, l'examen de la langue est un moyen facile et rapide d'identifier les porcs malades par les fermiers ou les éleveurs. Les cysticerques se trouvent sur la face inférieure de la langue et sont visibles à l'œil nu ou après palpation. Bien que la spécificité de cette technique soit de 100% (Gonzalez et al., 1990), des lésions mécaniques ou provoquées par des actinobactéries peuvent donner de faux positifs (de Aluja, 2008 ; Pouedet et al., 2002).

La sensibilité de la technique dépend de l'intensité de l'infection. Elle peut atteindre une valeur de 70% pour des porcs fortement infectés et seulement 20% dans le cas de faible infection (Dorny et al., 2004 ; Gonzalez et al., 1990). Avec l'utilisation de cette méthode, le taux de prévalence de la cysticerose porcine est souvent sous-estimé.

3.2 Test sérologique

Le diagnostic immunologique chez le porc est une méthode de détection plus sensible que l'examen lingual. Ce test est utile pour des études de prévalence ou épidémiologiques. Les techniques développées chez l'homme ont été adaptées pour la détection des anticorps et des antigènes de *T. solium* chez le porc (Pouedet et al., 2002).

Ces méthodes présentent certains inconvénients. Il existe un transfert passif des anticorps anti-cysticerquiens (Immunoglobuline G, IgG) entre la truie et le porcelet, qui persistent environ 6 mois (Gonzalez et al., 1999). De plus, les porcs peuvent également développer des anticorps transitoires (Dorny et al., 2003).

Une alternative aux anticorps monoclonaux a été développée récemment. Les « nanobodies » sont des anticorps spécifiques de *T. solium* avec un unique domaine dérivé des camélidés (Deckers et al., 2009). Cette nouvelle technique présente un grand potentiel pour le diagnostic spécifique de la cysticerose chez les porcs.

3.3 Inspection de la carcasse

Les recommandations officielles pour la détection de la cysticerose porcine lors de l'abattage varient entre les pays. Dans certains pays, le contrôle consiste en l'inspection visuelle d'un ou plusieurs muscles ou organes de l'animal ; contrairement à d'autres pays où plusieurs incisions dans différents organes du porc sont requises (Willingham et Engels, 2006).

L'inspection de la viande est un outil utile pour valider des techniques diagnostiques ou de nouvelles stratégies d'intervention. Cette méthode a cependant une sensibilité réduite dans le cas de faible infection. Par conséquent, la prévalence est également sous-estimée avec cette méthode. De plus, les éleveurs évitent les abattoirs officiels s'ils soupçonnent que leurs animaux sont infectés.

Le traitement de la cysticerose porcine se fait par l'oxfendazole en une dose de 30 mg/kg. Ce dosage permet d'éliminer 95% des cysticerques chez le porc (Garcia et al., 2003). Aucun effet secondaire n'a été observé. Une semaine après le traitement, la viabilité et le nombre des cysticerques sont clairement réduits (Gonzalez et al., 1998). Cependant, on trouve encore des cysticerques viables 4 semaines après le traitement.

Objectifs

La lutte contre un parasite nécessite de connaître parfaitement son environnement et son mode de transmission. Dans le cas de *T. solium*, nous devons prendre en considération les deux maladies dont il est responsable chez l'homme : cysticerose et taeniase. Mais, nous ne pouvons pas faire abstraction du domaine vétérinaire en étudiant seulement la cysticerose humaine. Dans cette étude, nous allons donc aborder les différents aspects du complexe Taeniase/Cysticerose en nous intéressant au système hôte-parasite dans son ensemble (hôte définitif, intermédiaire et parasite) avec les objectifs suivants :

Objectif principal :

- Approfondir les connaissances du complexe Taeniase/Cysticerose afin d'améliorer le diagnostic de la neurocysticerose humaine

Objectifs spécifiques:

- Etudier la diversité génétique de *T. solium* à Madagascar, au Cameroun et au Mexique.
- Estimer les dates de divergence pour mieux appréhender la biogéographie de *T. solium*.
- Elargir cette analyse aux autres *Taenia* qui parasitent l'homme : *T. saginata* et *T. asiatica* afin d'étudier leurs évolutions et leurs relations avec leurs hôtes.
- Comparer les différents outils de diagnostic biologique de la neurocysticerose.
- Evaluer une technique de PCR dans le diagnostic de la neurocysticerose.

Travail expérimental

Partie 1

Phylogénie et évolution de

Taenia solium

La connaissance des relations phylogénétiques est importante pour déduire le modèle d'évolution, identifier les taxons monophylétiques et élucider l'histoire et la biogéographie des espèces (Hoberg et al., 2000). Les études phylogénétiques nous informent sur l'origine de la diversité des espèces, sur l'histoire des hôtes ainsi que sur la distribution géographique du complexe hôte-parasite. Elles sont le fondement de la classification et des prédictions sur le comportement du parasite et sa biologie (Hoberg, 2006). Le développement des techniques moléculaires a permis l'obtention d'un grand nombre de séquences et donc une étude plus précise des variations génétiques interspécifiques ou intraspécifiques.

Neuf membres du genre *Taenia* (*T. taeniaeformis*, *T. hydatigena*, *T. pisiformis*, *T. ovis*, *T. multiceps*, *T. serialis*, *T. solium*, *T. saginata* et *T. asiatica*) ont été caractérisés d'après le gène mitochondrial de la sous unité 1 de la déshydrogénase NADH (Gasser et al., 1999). Des analyses phylogénétiques basées sur l'ADN mitochondrial ont permis de distinguer *T. saginata* de *T. asiatica* et de les placer dans un clade différent de *T. solium* (de Queiroz et Alkire, 1998). *Taenia asiatica* a été identifié comme une espèce à part entière grâce à l'étude du polymorphisme de plusieurs séquences : ARNr 28S, COI et ITS-1 (Internal transcribed spacer) (Bowles et McManus, 1994). Une analyse réalisée sur les gènes de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (*cox1*) et du cytochrome b (*cytb*) a permis de mettre en évidence 2 génotypes de *T. solium* (Nakao et al., 2002). Le premier regroupe les séquences asiatiques tandis que les séquences d'Amérique latine forment un groupe avec les séquences africaines.

Trois méthodes sont couramment utilisées pour les analyses phylogénétiques. La première est basée sur les mesures des distances évolutives entre séquences prises deux à deux (Saitou et Nei, 1987). Les deux autres sont des méthodes basées sur l'analyse des caractères (nombre de mutations qui affectent chaque site de la séquence) : la parcimonie (Hennig, 1966) et le maximum de vraisemblance (ML) (Cavalli-Sforza et Edwards, 1967 ; Felsenstein, 1981).

La méthode des distances, également appelée neighbor-joining (NJ), est une recherche heuristique basée sur le principe du minimum d'évolution. Elle produit des arbres sans racine, corrects si les distances sont additives. L'algorithme joint à chaque étape deux nœuds pour que la distance soit minimale. C'est la méthode la plus rapide, cependant le résultat obtenu peut être faux si le taux de substitution est trop élevé ou si ce taux varie entre les différentes branches. Cette méthode n'est donc pas recommandée pour analyser des séquences très divergentes. Elle est couramment utilisée pour explorer des données et permet une mesure globale. Les substitutions multiples ne sont pas prises en compte par ce type d'analyse.

La méthode de parcimonie suit le principe d'Occam selon lequel l'hypothèse la plus simple est probablement correcte. Cette méthode est indiquée pour l'analyse de caractères morphologiques ou de données fossiles. Elle prend en compte les états ancestraux. Les résultats dépendent du taux de substitution, qui ne doit pas être trop élevé. Cependant, le calcul des substitutions ne tient pas compte de la longueur des branches.

La méthode du maximum de vraisemblance détermine l'arbre avec la probabilité la plus forte étant donné l'alignement et le modèle d'évolution. Elle suppose donc l'utilisation d'un modèle d'évolution explicite. La longueur des branches est prise en compte pour le calcul de la vraisemblance. L'évolution des séquences est considérée comme un processus stochastique. Les différents modèles permettent d'incorporer la complexité du processus d'évolution, ce qui rend cette méthode très puissante. Si le modèle sélectionné est proche de la réalité alors l'arbre obtenu sera consistant. Cependant, les modèles trop simples peuvent engendrer l'attraction des branches trop longues ou trop courtes et sous-estimer la longueur des branches.

La fiabilité des arbres phylogénétiques est estimée avec la méthode du bootstrap. Un tirage au sort avec remise est réalisé pour chaque caractère. Plusieurs alignements sont générés et analysés. Cette technique permet de quantifier et moduler l'information afin de déterminer si le nœud est conservé.

Le développement des méthodes de datation moléculaire a permis l'essor de la biologie évolutive. Ces techniques peuvent être appliquées à toutes les espèces ou périodes (Welch et Bromham, 2005). Elles donnent un aperçu du passé de certaines lignées pour lesquelles peu de données (fossiles) sont disponibles.

La détermination des dates de divergences basée sur l'analyse moléculaire de séquences nécessite plusieurs étapes. La distance génétique entre deux séquences ou taxa, pour lesquels une date est connue, doit être disponible. Le taux de substitution doit ensuite être calculé par rapport à la distance génétique et la date. Ce taux peut ensuite être utilisé pour convertir les distances génétiques entre taxon en estimation de leur date de divergence (Renner, 2005).

Une hypothèse pour la phylogénie du genre *Taenia* est basée sur l'analyse de 27 caractères structuraux de l'adulte ou métacéstode (Hoberg et al., 2000). Cette analyse cladistique a permis d'obtenir les 4 arbres phylogénétiques les plus parcimonieux.

Taenia est un large genre contenant approximativement 42 espèces et 3 sous-espèces. La transmission des ténias est influencée par l'écologie ; leur cycle de vie est dépendant des associations prédateur-proie au sein des mammifères, hôtes intermédiaires (HI) et hôtes définitifs (HD). La diversification ou spéciation au sein du genre *Taenia* a largement été influencée par les changements de hôtes définitifs entre carnivores. Il est possible de déterminer la contribution relative des hôtes définitifs et des hôtes intermédiaires dans la diversification du parasite, en étudiant la phylogénie de ce dernier (Hoberg, 2006).

Deux hypothèses s'opposent quant au déroulement de l'acquisition de l'homme comme hôte définitif de 3 espèces de ténia : *T. solium*, *T. saginata* et *T. asiatica*. Le changement d'hôte se serait produit lors de la domestication des animaux (de Queiroz et Alkire, 1998) ou l'ancêtre de l'homme serait devenu hôte définitif par l'intermédiaire des animaux sauvages, porteurs de la cysticercose (Baer, 1940). Le maintien du cycle de *T. solium* dans la population humaine a également pu être facilité par le cannibalisme (Defleur et al., 1999).

Les félidés seraient les hôtes définitifs ancestraux présumés du genre *Taenia* (Hoberg et al., 2000). Les hôtes contemporains semblent avoir résulté de changement d'hôte entre félidés, canidés, hyénidés et autres carnivores. Les arbres les plus parcimonieux indiquent que l'espèce la plus proche de *T. solium* est *T. hyena*. Leurs ancêtres communs auraient les hyénidés comme hôtes définitifs et les bovidés comme hôtes intermédiaires. Pour *T. saginata* et *T. asiatica*, l'espèce la plus proche est *T. simbae* et leur ancêtre commun aurait eu un félidé comme hôte définitif et un bovidé comme hôte intermédiaire (Hoberg et al., 2001).

Les études phylogénétiques des ténias « humains » indiquent des origines indépendantes pour *T. solium* et pour *T. saginata* & *T. asiatica*. La relation entre les hominidés et ces ténias a été établie en Afrique sub-saharienne il y a 1-2,5 millions d'années. Le changement d'hôte définitif des félidés ou hyénidés aux ancêtres de l'homme s'est produit approximativement à la transition Pliocène-Pléistocène. *Taenia saginata* et *T. asiatica* ont changé des félidés aux hominidés tandis que *T. solium* a indépendamment colonisé le genre *Homo* à partir de la hyène (Hoberg, 2006).

Les premiers hôtes intermédiaires, herbivores, montrent une coévolution plus subtile. Les rongeurs semblent être les hôtes intermédiaires ancestraux des *Taeniidae* (*Taenia* + *Ecchinococcus*) puis les ongulés sont ensuite apparus comme hôtes intermédiaires. L'acquisition des ruminants ou lagomorphes comme hôtes intermédiaires s'est produit indépendamment, avec de multiples événements de colonisation. Les cervidés et suidés sont devenus hôtes intermédiaires indépendamment (Hoberg et al., 2000). Pour *T. solium*, plusieurs espèces sont susceptibles de jouer le rôle d'hôtes intermédiaires : *Sus scrofa*, *Potamochoerus porcus*, *Homo sapiens*, les primates, les lagomorphes, les canidés et les procavidés (Hoberg et al., 2001). Les bovins sont les hôtes intermédiaires de *T. saginata* tandis que *T. asiatica* partage le même hôte intermédiaire que *T. solium*.

Nous avons voulu étudier plus précisément la phylogénie de *T. solium*, qui présente cette diversification génétique particulière à l'origine géographique. Notre étude a d'abord concerné exclusivement des souches de Madagascar. Nous avons ensuite élargi le champ de travail avec des séquences du Mexique et du Cameroun. L'évolution spécifique de *T. solium* a soulevé des questions par rapport aux deux autres espèces qui parasitent l'homme. Cette partie se termine par notre hypothèse sur l'influence des hôtes et d'autres facteurs sur l'évolution et la diversification des parasites.

I. Etude de la diversité de *T. solium* à Madagascar, au Cameroun et au Mexique

Une variabilité intra-spécifique limitée a été observée entre les isolats de *T. solium* de différents pays (Campbell et al., 2006). Une étude RAPD (Random Applied Polymorphic DNA), qui permet l'analyse d'un grand nombre de loci, a été réalisée sur 160 cysticerques de plusieurs pays d'Amérique latine et d'Afrique (Maravilla et al., 2003). Elle a mis en évidence l'existence de lignée locale avec de possibles évènements de recombinaison. La structure de la population de *T. solium* a également été étudiée par une analyse RAPD sur des cysticerques de Madagascar et du Mexique (Vega et al., 2003). Une différenciation génétique a été observée entre les échantillons malgaches et mexicains ainsi qu'au sein des échantillons des différentes régions du Mexique. Cependant la variabilité génétique reste faible comme le montre une étude sur les séquences *cox1*, ITS-1 et de l'antigène Ts14 d'isolats d'Amérique et d'Asie (Hancock et al., 2001). Ces résultats correspondent à la nature hermaphrodite de ce parasite (Hartl et Clark, 1997). La relation génétique entre des cysticerques prélevés chez l'homme et le porc a été étudiée. L'analyse de la séquence mitochondriale *cox1* et de la séquence ribosomale ITS-1 a montré une grande similarité entre ces prélèvements (Hinojosa-Juarez et al., 2008).

1. Matériels et méthodes

1.1 Les échantillons

a. A Madagascar

Les cysticerques (CC) sont issus de prélèvements effectués lors de l'abattage de porcs entre septembre 2005 et mars 2006. Le transport a été réalisé par voie aérienne ou routière dans des sachets individuels documentés à double fermeture hermétique avec accumulateur de froid jusqu'à l'Institut Pasteur de Madagascar (IPM). Nous avons collecté 13 échantillons provenant de 5 des 6 provinces de Madagascar (Figure 5) : 2 de la région de Mahajanga (Mahajanga, Namakia), 3 de la région de Toamasina (Morarano, Ambatondrazaka, Mahanoro), 5 de la région de Antananarivo (Andravoahangy, Andohatampenaka, Analavory, Arivonimamo, Itasy), 2 de la région de Toliara (Toliara 1 & 2) et 1 de la région de Fianarantsoa (Tanambao).



Figure 5: Distribution géographique des sites d'échantillonnage à Madagascar. Ambatondrazaka ☆, Analavory ◆, Andohatampenaka ▼, Andravoahangy ■, Arivonimamo ★, Itasy ▽, Mahanoro △, Mahajanga †, Morarano ◇, Namakia ▲, Tanambao □, Toliara ✕

b. Au Cameroun

Notre collaboration avec le Professeur Roger Moyou nous a permis d'obtenir des échantillons prélevés entre décembre 2007 et janvier 2008 (Tableau 1) dans plusieurs abattoirs de Yaoundé. Différentes parties de 6 porcs ont été prélevées lors de l'abattage, individualisées dans des sachets documentés puis envoyées en France par voie aérienne à -20°C pour y être disséquées. Nous avons collecté 13 morceaux de viande de 6 porcs (5 de la province extrême nord du Cameroun et 1 de la province Ouest) (Figure 6).

Tableau 1 : Liste des échantillons de cysticerques (CC) du Cameroun

N° CC	N° Porc	Date d'abattage	Origine géographique	Partie anatomique
1	1	03/12/07	Province extrême Nord, Région Yagoua	patte arrière
2	2	05/12/07	Province extrême Nord, Région Yagoua	langue
3				côte
4	3	17/01/08	Province extrême Nord, Région Yagoua	patte avant
5				colonne
6				patte arrière
7	4	18/01/08	Province extrême Nord, Région Yagoua	cœur
8	5	21/01/08	Province Ouest, Localité Mbouda	cœur
9				langue
10				omoplate
11				patte arrière
12	6	22/01/08	Province extrême Nord, Région Yagoua	langue
13				oreille

c. Au Mexique

Notre collaboration avec le laboratoire d'Edda Sciutto à l'« Instituto de Investigaciones Biomedicas » de l'UNAM (Universidad Nacional Autonoma de Mexico) nous a permis de collecter d'autres échantillons. Les cysticerques proviennent de prélèvements effectués lors de l'abattage des porcs. Cinq porcs proviennent de la région centrale du Mexique (Etat de Mexico) et ont été sacrifiés entre avril et novembre 2008 (Tableau 2). Deux porcs proviennent de la région du Yucatan et ont été sacrifiés en 2007 (Figure 7). Des cysticerques ont été prélevés dans différentes parties anatomiques du porc.



Figure 6: Distribution géographique des sites d'élevage des porcs au Cameroun (□ Province Extrême Nord, région Yagoua ; ◇ Province Ouest, localité Mbouda).



Figure 7: Distribution géographique des sites d'élevage des porcs au Mexique.

Tableau 2 : Liste des échantillons de cysticerques (CC) du Mexique

N° CC	Origine géographique	N° Porc	Date d'abattage	Partie anatomique
1				cerveau
2				tête
3				masséter droit
4				masséter gauche
5	Etat de Mexico	1	01/04/08	cou
6				patte avant
7				cœur
8				côte
9				patte arrière
10				masséter
11				cou
12				patte avant droite
13	Etat de Mexico	2	03/07/08	patte avant gauche
14				épaule
15				côte
16				patte arrière droite
17				patte arrière gauche
18				cerveau
19				langue
20				patte avant droite
21	Etat de Mexico	3	21/08/08	patte avant gauche
22				épaule
23				côte
24				patte arrière droite
25				patte arrière gauche
26	Etat de Mexico	5	04/11/08	cerveau
27				cerveau
28	Yucatan	1	2007	patte arrière
29	Yucatan	2	2007	patte arrière
30				cerveau
31				cerveau
32				langue
33				patte avant droite
34	Etat de Mexico	4	30/09/08	patte avant gauche
35				épaule
36				côte
37				patte arrière droite
38				patte arrière gauche

1.2 Les marqueurs mitochondriaux

Les gènes mitochondriaux sont largement utilisés pour étudier le polymorphisme de *T. solium* et construire la phylogénie du genre *Taenia*. Le génome mitochondrial est considéré comme clonal et rarement ou jamais soumis à la recombinaison (Le et al., 2000). Les gènes mitochondriaux sont d'excellents marqueurs moléculaires pour définir des groupes de population, pour étudier l'histoire génétique d'un groupe d'isolats ainsi que pour construire des phylogénies (Le et al., 2000). Ces marqueurs mitochondriaux sont transmis par les femelles. La nature hermaphrodite du *Taenia* rend ce type de marqueur intéressant car il ne retrace pas uniquement la phylogénie maternelle.

Le polymorphisme génétique de 13 isolats de *T. solium* de différentes régions a été déterminé d'après l'étude des gènes mitochondriaux *cytb* et *cox1* (Nakao et al., 2002). L'analyse phylogénétique a permis d'identifier deux génotypes de *T. solium* corrélés à la distribution géographique des isolats grâce à deux sites polymorphiques du gène *cox1* en position 690 et 723 (Nakao et al., 2002). Un premier cluster est composé des séquences d'Asie, tandis que les séquences d'Afrique forment un second cluster avec les séquences d'Amérique latine (Ito et al., 2003b).

a. La PCR

L'ADN de tous les cysticerques a été extrait grâce au DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Pour chaque cysticerque, deux gènes mitochondriaux ont été amplifiés : le cytochrome b (*cytb*) et la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase (*cox1*) (Tableau 3). Pour les échantillons de Madagascar, une séquence partielle du gène *cox1* a été amplifiée d'une longueur de 984 pb.

Tableau 3 : Séquences de amorces pour les gènes *cytb* et *cox1*.

Gène	Longueur du fragment	Amorces	Référence
<i>cytb</i>	1068 pb	sens 5'-ATAAACTGATAGATTGTGGTTC-3' antisens 5'-CATATGACTGTCTAATGAAGAAAA-3'	(Nakao et al., 2002)
<i>cox1</i>	1620 pb	sens 5'-GTTATGTTAGACTAGATGTTTTCA-3' antisens 5'-TCCACTAAGCATAATGCAAAGGC-3'	(Nakao et al., 2002)
<i>cox1</i>	984 pb	sens 5'-TTGTTATAAATTTTTGATTACTAAC-3' antisens 5'-GACATAACATAATGAAATG-3'	(Yamasaki et al., 2004)

Le mélange réactionnel a été réalisé dans un volume de 50 µl contenant chaque dNTP à 200 µM final, les amorces sens et antisens (synthétisées par Operon, Ebersberg, Allemagne) à 0,5 µM final, une unité de Taq polymérase (Phusion™, high-fidelity DNA polymerase, Finnzymes, Saint Quentin en Yvelines, France), complété avec du tampon 5X et de l'eau distillée.

Pour le gène *cytb* : Faire une dénaturation initiale à 98°C pendant 30s, puis 30 cycles avec une dénaturation à 98°C de 10s, une hybridation à 58°C de 30s et une élongation à 72°C de 45s et enfin une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

Pour le gène *cox1* : Faire une dénaturation initiale à 98°C pendant 30s, puis 30 cycles avec une dénaturation à 98°C de 10s, une hybridation à 56°C de 30s et une élongation à 72°C de 60s et enfin une élongation finale à 72°C pendant 5 min.

b. Le séquençage

Pour les échantillons de Madagascar, nous avons réalisé le séquençage à la Plate-Forme Génomique de l'Institut Pasteur de Paris (IPP) (Pasteur Genopole® Ile de France) grâce la collaboration du Dr Christiane Bouchier. Les produits PCR (Polymerase chain réaction) sont purifiés par filtration sur une microplaque à fond filtrant (Multiscreen MAHV N45, Millipore, Molsheim, France) contenant une solution de Biogel P100 gel fine (Biorad, Marne la coquette, France). Les amplicons purifiés sont séquencés en utilisant le kit ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction version 3.1 (Applied Biosystems, Foster city, Californie, USA) avec les amorces M13-20 et M13 reverse. Les réactions de séquences sont analysées sur une séquence ABI3730 xl.

Pour les échantillons du Cameroun et du Mexique, nous avons purifié les produits de PCR avec QIAquick® PCR purification kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les échantillons purifiés ont ensuite été envoyés à un prestataire de service (Millegen, Toulouse, France) qui a réalisé le séquençage. Le séquençage a été réalisé avec les amorces sens et anti-sens. Nous avons ainsi obtenu la totalité de la séquence amplifiée.

1.3 L'analyse phylogénétique

a. L'analyse et l'alignement des séquences

Nous avons ensuite analysé les séquences obtenues avec le logiciel BioEdit v7.0.5 (Hall, 1999). Ce logiciel permet d'éditer les séquences et de vérifier la qualité du séquençage grâce au chromatogramme. Lors de cette première étape, la séquence sens d'un échantillon est alignée avec la séquence reverse complémentaire anti-sens. La zone de recouvrement entre les deux séquences dépend de la qualité du séquençage et de la longueur du fragment. Le fragment amplifié par PCR est d'une longueur de 1298 paires de bases (pb) pour *cytb* et 1803 pb pour *cox1*. La séquence obtenue est ensuite coupée afin d'obtenir uniquement la séquence du gène d'une longueur de 1068pb et 1620 pb pour *cytb* et *cox1* respectivement.

Nos séquences sont ensuite alignées avec plusieurs séquences de référence de la base de données EMBL/Genbank. Les dix séquences de référence d'ADN de *cox1* et *cytb* proviennent d'isolats de *T. solium* de 9 pays d'Asie, d'Afrique et d'Amérique Latine (Tableau 4). Nous avons également travaillé sur 3 séquences du gène *cox1* de *T. asiatica* et 15 séquences du gène *cox1* de *T. saginata* (Tableau 4).

Cette étape d'alignement est réalisée avec le logiciel ClustalX 1.83 (Thompson et al., 1999). Ce logiciel permet de réaliser des alignements multiples et d'éditer des arbres phylogénétiques. Les alignements doivent être sauvegardés sous différents formats pour les applications ultérieures. Le format FASTA (extension .fas) est couramment utilisé par de nombreux logiciels ou NCBI. Il permet de décrire chaque séquence. Le format NEXUS (extension .nxs) est notamment utilisé par le logiciel Modeltest. Le format PHYLIP (extension .phy ou .ph) a été créé par Joe Felsenstein pour son logiciel et est maintenant couramment utilisé par d'autres programmes de phylogénie. Le nombre de caractère pour le nom des séquences est limité à 10.

Nous avons utilisé le logiciel Seqout pour obtenir les figures d'alignement de séquence. Ce logiciel permet d'étudier des séquences nucléotidiques ou protéiques. Plusieurs options sont disponibles et permettent de montrer uniquement les sites polymorphiques ou les mutations silencieuses, etc. Ce logiciel ne peut lire que les fichiers au format MEGA (Kumar et al., 1994).

b. La sélection du modèle de substitution

Le modèle de substitution approprié est ensuite sélectionné parmi 56 modèles d'évolution de séquence avec Modeltest 3.0 (Posada et Crandall, 1998, 2001) intégré dans le logiciel Hy-Phy Win32 (Pond et al., 2005). Ce modèle prend en compte les fréquences des 4 bases (A, T, G et C) ainsi que les transitions ou transversions. La distribution gamma (Γ) est utilisée pour corriger les variations de substitutions entre les différents sites. Une certaine proportion des sites peut être invariable (I). Dans ce cas, la distribution gamma ne s'appliquera qu'aux sites libres de varier.

Nous avons utilisé le logiciel jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) pour les analyses les plus récentes. Cette nouvelle version du logiciel est plus performante et permet de comparer 88 modèles d'évolution.

Ce logiciel compare notre matrice de données de séquences avec la matrice de modèle d'évolution afin de déterminer le modèle qui correspond le mieux à nos données.

c. La construction des arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques sont ensuite construits selon la méthode du maximum de vraisemblance dans le logiciel Phyml (Guindon et Gascuel, 2003).

Les méthodes des distances et de la parcimonie (dnaps) sont réalisées dans le logiciel Phylip (Felsenstein, 2005). Pour la méthode des distances, le calcul des distances (dnadist) est tout d'abord réalisé puis l'arbre des distances évolutives est construit selon la méthode du neighbor joining (neighbor).

Le niveau de confiance statistique a été évalué par la méthode non-paramétrique du bootstrap (Felsenstein, 1985), qui donne le pourcentage d'arbre (100 itérations) dans lesquels le même nœud intérieur apparaît. Les itérations sont générées à partir de l'alignement de départ (seqboot).

Les nœuds pour lesquels la valeur du bootstrap est supérieure à 90% sont considérés comme fortement soutenus. Les nœuds avec des valeurs de bootstrap entre 70% et 89% sont considérés comme modérément soutenus.

Tableau 4: Liste des séquences (*cox1*, *cytb*) avec le pays d'origine et les N° d'accension

Espèce	Pays d'origine	Genbank N° accession	Références
<i>Taenia asiatica</i>	Taiwan	AB066494, AB066580	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia asiatica</i>	Taiwan	AB107234	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia asiatica</i>	Chine	AB107235	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia asiatica</i>	Indonésie	AB107236	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Chine	AB066495, AB066581	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia saginata</i>	Brésil	AB107237	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Equateur	AB107238	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Chine	AB107239	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Indonésie, Bali	AB107240	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Ethiopie	AB107241	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Belgique	AB107242	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Népal	AB107243	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Thaïlande, Bangkok	AB107244	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Thaïlande	AB107245	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Brésil, Mato grosso do sul	AB107246	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Chine, Yunnan	AB107247	(Yamasaki et al., 2004)
<i>Taenia saginata</i>	Mongolie	AB271695	(Myadagsuren et al., 2007)
<i>Taenia saginata</i>	Cambodge	AB275143	(Myadagsuren et al., 2007)
<i>Taenia saginata</i>	Belgique	AY195858	(Jeon et Eom, 2006)
<i>Taenia solium</i>	Chine CHI1	AB066485, AB066570	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Chine CHI2	AB066486, AB066571	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Thaïlande	AB066487, AB066572	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Indonésie, Irian jaya	AB066488, AB066573	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Inde	AB066489, AB066574	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Mexique	AB066490, AB066575	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Equateur	AB066491, AB066576	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Brésil	AB066492, AB066577	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Tanzanie	AB066493, AB066578	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Cameroun	AB066490, AB066579	(Nakao et al., 2002)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Analavory	FM958305, FM958318	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Andravoahangy	FM958306, FM958319	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Namakia	FM958307, FM958320	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Andohatampenaka	FM958308, FM958321	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Ambatondrazaka	FM958309, FM958322	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Mahajanga	FM958310, FM958323	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Arivonimamo	FM958311, FM958324	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Itasy	FM958312, FM958325	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Mahanoro	FM958313, FM958326	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Tanambao	FM958314, FM958327	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Morarano	FM958315, FM958328	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Toliara	FM958316, FM958329	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Madagascar, Toliara	FM958317, FM958330	(Michelet et al., 2010)
<i>Taenia solium</i>	Cameroun, Nord	FN995665, FN995667	Unpublished
<i>Taenia solium</i>	Cameroun, Ouest	FN995666, FN995668	Unpublished
<i>Taenia solium</i>	Mexique, Etat de Mexico 1	FN995657, FN995661	Unpublished
<i>Taenia solium</i>	Mexique, Etat de Mexico 2	FN995658, FN995662	Unpublished
<i>Taenia solium</i>	Mexique, Etat de Mexico 3	FN995659, FN995663	Unpublished
<i>Taenia solium</i>	Mexique, Yucatan	FN995660, FN995664	Unpublished

1.4 L'estimation des dates de divergence

Nous avons utilisé le programme BEAST (Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees) v.1.4.5A pour estimer les dates de divergence des groupes de *T. solium* (Drummond et Rambaut, 2007). Cette méthode bayésienne est considérée comme supérieure aux autres approches. En effet, elle permet d'intégrer une incertitude dans la calibration des dates et ne nécessite pas obligatoirement d'horloge moléculaire.

Nous avons testé plusieurs modèles de datation avant d'en sélectionner un. Plusieurs paramètres ont été modifiés : l'horloge moléculaire (stricte ou relâchée), la croissance de la population (taille constante ou croissance exponentielle), le taux de mutation par million d'années (modèle *T. saginata*/*T. asiatica* ou modèle rat/souris) et l'utilisation d'une date (déterminé par Hoberg). Les taux de mutations sont différents entre les espèces mais également entre les souches d'une même espèce (Baer et al., 2007). Les processus de mutation varient également entre les génomes nucléaires ou mitochondriaux.

L'hypothèse de l'horloge moléculaire est à la base l'approche phylogénétique actuelle pour la datation. L'hétérogénéité des taux de mutations entre les lignées a conduit à des déviations de cette horloge moléculaire (Gaunt et Miles, 2002). De nombreuses méthodes ont été développées afin de « relâcher » l'horloge moléculaire pour estimer les dates de divergences entre espèces (Kumar, 2005).

Sur les dix modèles que nous avons testé (Tableau 5), le modèle n°6 a été sélectionné. Etant donné l'absence de fossile et les variations probables de taux de mutation entre *T. saginata*, *T. asiatica* et le reste de l'arbre, nous avons choisi d'utiliser une méthode relâchée pour estimer les dates de divergence des différents clades de *T. solium* (Drummond et al., 2006). Le modèle basique coalescent d'une population de taille constante est en accord avec la taille de la population réduite de *T. solium* qui résulte de son mode de reproduction (Hartl et Clark, 1997). L'autofécondation est largement dominante mais certains cas de double infestation ont été décrits (de Meeus et al., 1998). La recombinaison génétique existe mais est extrêmement lente. Le taux déterminé avec les séquences de *T. saginata* et *T. asiatica* semble plus approprié que celui du modèle rat/souris.

Tableau 5: Comparaison de différents modèles de datation obtenus avec le gène *cytb*.

				Valeur <i>T. saginata/T. asiatica</i>	<i>T. saginata / T. asiatica</i>		<i>T. solium</i> génétype asiatique	<i>T. solium</i> génétype africain/américain
					<i>T. saginata</i>	<i>T. asiatica</i>		
1	UPGMA	taux 0.0195/Ma			1,245 (0,78 – 1,71)		0,126	0,129
2	Horloge stricte	date UPGMA	date /Millions	Population à taille constante	2,2	0,583	0,254	0,24
3	Horloge relâchée	date UPGMA	date /Millions	Population à taille constante	1,327	0,285	0,166	0,171
4	Horloge relâchée	date UPGMA	date /Millions	Population à croissance exponentielle	1,658	0,325	0,169	0,176
5	Horloge relâchée	taux 0.0195/Ma	Valeur <i>T. saginata/T. asiatica</i>	Population à taille constante	1,902	0,724	0,323	0,319
6	Horloge relâchée	taux 0.0195/Ma sans date	Valeur <i>T. saginata/T. asiatica</i>	Population à taille constante	0,919	0,686	0,266	0,237
7	Horloge relâchée	taux 0.0195/Ma	Valeur <i>T. saginata/T. asiatica</i>	Population à croissance exponentielle	2,26	0,602	0,24	0,233
8	Horloge relâchée	taux 0.0195/Ma sans date	Valeur <i>T. saginata/T. asiatica</i>	Population à croissance exponentielle	0,996	0,571	0,203	0,177
9	Horloge relâchée	taux 0.0179/Ma	valeur rat/souris	Population à taille constante	1,969	0,771	0,342	0,338
10	Horloge relâchée	taux 0.0179/Ma	valeur rat/souris	Population à croissance exponentielle	2,33	0,632	0,25	0,244

Les modèles 5 et 6 diffèrent uniquement par l'intégration de la date de divergence entre *T. saginata* et *T. asiatica*. Cette date est recalculée par le logiciel en intégrant le taux de substitution que nous avons déterminé. Dans le modèle n°5, la date ainsi réévaluée est de 1,9 Ma. Elle est supérieure à la valeur maximale déterminée par Hoberg de 1,71 Ma. Nous avons choisi le modèle pour que cette date entre dans l'intervalle de 0,78 à 1,71 Ma. L'utilisation du taux de substitution calculé sur la base du modèle rat/souris donne également des dates antérieures : 1,969 Ma si la taille de la population est constante et 2,33 Ma si la croissance de la population est exponentielle.

Nous avons donc adopté le modèle GTR (General Time Reversible), préalablement sélectionné par Modeltest 3.0, avec une distribution gamma des taux de substitution. Les taux pour les gènes *cytb* et *cox1* ont été calculés à 0,0195 et 0,0225 substitution par site et par million d'année (Ma) respectivement. Ces taux ont été déterminés à partir de la distance génétique entre *T. saginata* et *T. asiatica* qui ont divergé il y a 1,245 Ma (0,78 - 1,71). Au préalable, un arbre ultramétrique a été construit selon le modèle d'évolution sélectionné avec Modeltest en utilisant la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) intégré dans le logiciel PAUP (Swofford, 2000). Le modèle de population génétique choisi assume une taille de population constante sur la période de temps considérée.

Ce modèle et l'arbre UPGMA ont été utilisés pour obtenir l'arbre de départ de cette analyse. Une horloge moléculaire relaxée (distribution lognormal non corrélée) a été utilisée pour spécifier la probabilité du taux de substitution sur chaque branche pendant le processus d'échantillonnage MCMC (Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo) (Drummond et al., 2006).

Nous avons utilisé le même modèle pour l'étude des dates de divergences des 3 espèces de *Taenia*, sur 3 séquences de *T. asiatica* (Nakao et al., 2002 ; Yamasaki et al., 2004) et 20 séquences de *T. saginata* (Jeon et Eom, 2006 ; Myadagsuren et al., 2007 ; Nakao et al., 2002 ; Yamasaki et al., 2004). La valeur du taux a été calculé avec la même méthode et était de 0.0212 substitution par site et par million d'année.

Nous avons utilisé le programme Tracer v.1.4. pour vérifier la convergence des chaînes McMC à une distribution stationnaire ainsi que pour résumer les erreurs de paramètres et d'intervalle de confiance (Rambaut et Drummond, 2007). Nous avons obtenu des résultats stables entre les différentes chaînes McMC (10^8 steps) ou une taille d'échantillon effective suffisante (ESS >1000) pour chaque nœud représentant l'ancêtre commun le plus récent. Une estimation bayésienne des dates de divergence a été déduite de la distribution bayésienne postérieure de la divergence des groupes. Les calculs ont été réalisés en triplicate et une moyenne des dates obtenues a été calculée pour chaque nœud.

2. Résultats

2.1 Le polymorphisme des séquences de *T. solium*

a. A Madagascar

Nous avons analysé les séquences nucléotidiques de deux gènes mitochondriaux. Ce travail a été réalisé sur 13 nouveaux spécimens de cysticerques de *T. solium* collectés chez des porcs de Madagascar. Nous avons obtenu 13 séquences, sans gap ni codons stop, de 957 pb pour le gène *cox1* et 1068 pb pour le gène *cytb* (N° accession FM958305 à FM958317, FM958318 à FM958330). Le gène *cytb* semble le plus informatif avec 33 sites polymorphiques sur la totalité du gène. Seulement 19 sites polymorphiques sont obtenus pour le gène *cox1*, mais nous ne disposons que d'une séquence partielle du gène.

Six sites polymorphiques dans le marqueur *cox1* nous permettent de diviser les séquences en 2 groupes (Figure 8 A). Les séquences de Chine, d'Inde, d'Indonésie et de Thaïlande portent les nucléotides suivants G453, G690, C723, G861, A867, et C1065. Cette signature caractérise le génotype asiatique. Les séquences du Brésil, d'Equateur, du Mexique, du Cameroun et de Tanzanie portent les nucléotides A453, A690, T723, A861, G867, et T1065, la signature caractérisant le génotype africain/américain. Nakao et al (2002) ont décrit les mutations en position 690 et 723 que nous observons également.

11111	1224667788899901111	11122223334445555566667779990	1
China 1	9465692503666960022	169966914677248146034615792890143	
China 2	9383603777173451768	696789799478104472853121239883463	
India	ATAGGGCACAGATGCTTGT	CGGGATACCTTAGGATCCGGCTTTGGACAAAA	
Irian JayaA.....A.....A.....	
ThailandA.....G.....A.G..A.....	
Analavory	G.G.A.....	..TA...GT..C...G..A.....	
Andravoahangy	.C.....A.....G.....G..A.....T.....	
AndohatampenakaA.....G.....G..A.....	
ArivonimamoA.....G.....G..A.....	
ItasyA.....G.....G..A.....	
MahajangaA.....G.....G..A...C.....	
NamakiaA.....G.....G..A.....	
AmbatondrazakaA.....G.....G..A.....	
MahanoroA.....G.....G..A.....	
MoraranoA.....G.....G..A.....	
TanambaoA.....G.....G..A.....G..T.T	
Toliara 1	..GA.AT...AG..TCGTA	..T.A.G.G.T..G..GGT.A.TCCGAA..GGG.	
Toliara 2	..GA.AT...AG..TCGTA	..T.A.G.G.T..G..GGT.A.TCCGAA..GGG.	
Brazil	..GA.ATG.GAGC.T....	..T.A.GCG.T..GC.GGT.A.TCCCAA..G...	
Ecuador	..GA.AT.T.AG..T....	..T.A.G.G.T..G..GGT.A.TCCGAA..GGG.	
Cameroon	..GA.ATG.GAGC.T....	TT.A.GCG.T..GC.GGT.A.TCCCAA..G...	
Mexico	..GA.ATG.GAGC.T....	..T.A.G.G.T..GC.GGT.A.TCCCAA..G.G.	
A. Tanzania	..GA.AT...AG..T....	..T.A.G.G.TC.G..GGTTAATCCCAA..G.G.	
B. Tanzania			

Figure 8: Sites polymorphiques des séquences de Madagascar pour le gène *cox1* (A) et le gène *cytb* (B) obtenus avec le logiciel Seqout.

Onze sites polymorphiques sur la séquence de *cytb* permettent également de différencier les 2 génotypes de *T. solium* (Figure 8 B). La signature nucléotidique suivante G69, A169, C264, A321, A414, C462, C561, T612, G693, G729 et A903 a été retrouvée dans toutes les séquences de *T. solium* d'Asie (Chine Inde, Indonésie et Thaïlande). Les séquences de pays africains et américains (Brésil, Equateur, Mexique, Cameroun et Tanzanie) contiennent, quant à elles, les nucléotides suivants T69, G169, T264, G321, G414, T462, T561, C612, A693, A729 et G903.

Les séquences de *cox1* et *cytb* de 11 échantillons collectés à Ambatondrazaka, Analavory, Andohatampenaka, Andravoahangy, Arivonimamo, Itasy, Mahanoro, Mahajanga, Morarano, Namakia, et Tanambao ont la même signature nucléotidique que les séquences de pays asiatiques. Les deux séquences de Toliara, situé sur la côte ouest de l'île, portent la signature caractéristique du génotype africain/américain.

Donc les deux génotypes de *T. solium* sont observés à Madagascar avec une prédominance de génotype asiatique. Un faible polymorphisme est observé au sein des séquences d'Asie.

Pour les 2 gènes, les différences nucléotidiques sont plus importantes pour les séquences des spécimens collectés en Indonésie que pour celles collectées ailleurs. Les séquences de *cytb* de Chine ont 2 nucléotides spécifiques A219 et G535. Les séquences de *cytb* d'Inde et de Thaïlande sont les plus similaires à celles de Madagascar. Les séquences de *T. solium* de Tanambao et Mahajanga ont des mutations dans le gène *cytb* qui ne sont pas observées dans les autres séquences de Madagascar. La séquence de *cox1* d'Inde est identique à celles des spécimens collectés à Madagascar.

De même, un faible polymorphisme dans les séquences *cytb* et *cox1* est observé entre les séquences d'Afrique et d'Amérique. Les séquences de *cox1* du Cameroun, du Mexique et du Brésil portent 3 nucléotides spécifiques : G757, G837 et C963. La séquence de *cytb* ne peut pas être utilisée pour différencier les spécimens de Toliara et d'Equateur alors que 4 nucléotides de la séquence de *cox1* des spécimens de Toliara permettent de distinguer ces séquences de toutes les autres collectées en Afrique et en Amérique.

b. Au Cameroun

Les séquences *cox1* et *cytb* (Figure 9 A & B) de *T. solium* collectés au Cameroun ne présentent aucun polymorphisme. Les cysticerques collectés proviennent de 5 porcs différents, de 2 localisations géographiques et de différentes parties anatomiques des porcs. Ces séquences sont identiques à la séquence de référence du Cameroun.

Les séquences du gène *cox1* provenant du Cameroun sont similaires à celle provenant du Mexique (Figure 9A). Un faible polymorphisme est observé entre les séquences des continents africain et américain. Les séquences asiatiques comportent quant à elles 10 nucléotides variables. Douze sites nucléotidiques permettent de distinguer les 2 génotypes de *T. solium*. La signature nucléotidique suivante permet d'identifier les séquences d'origine asiatique : C189, G453, G690, C723, G861, A867, C1065, C1164, G1302, G1360, C1599 et A1608. Les séquences africaines et américaines présentent cette signature nucléotidique : T189, A453, A690, T723, A861, G867, T1065, T1164, A1302, A1360, T1599 et G1608.

Le nucléotide 16 des séquences *cytb* permet de distinguer les séquences du Cameroun (T16) de toutes les autres séquences (C16) (Figure 9B). Le polymorphisme est faible entre les séquences africaines et américaines ainsi qu'entre les séquences asiatiques (9 et 10 sites polymorphiques respectivement).

Les séquences *cytb* présentent également 12 sites polymorphiques permettant la distinction entre génotype africain/américain (T69, G169, T264, G321, G414, T462, T561, C612, C651, A693, A729 et G903) et génotype asiatique (G69, A169, C264, A321, A414, C462, C561, T612, T651, G693, G729 et A903).

Les sites polymorphiques distinguant les 2 génotypes correspondent aux sites identifiés avec les séquences de Madagascar. Les séquences *cox1* présentent un plus grand polymorphisme et plus de sites informatifs car la séquence est complète. Les séquences de Madagascar présentent les 6 sites polymorphiques caractérisant la signature génotypique sur la portion de gène amplifiée. Le nucléotide en position 651 de la séquence *cytb* n'était pas informatif pour l'analyse des séquences de Madagascar car la séquence de Mahajanga portait la même mutation (C651) que les séquences africaines et américaines.

c. Au Mexique

Une analyse similaire a été réalisée sur des cysticerques mexicains collectés dans 2 régions du Mexique : l'état de Mexico (5 porcs) et le Yucatan (2 porcs).

Le polymorphisme des séquences est plus important pour le gène *cytb* (10 sites polymorphiques pour les séquences africaines et américaines et 10 pour les séquences asiatiques) que pour le gène *cox1* (6 sites polymorphiques pour les séquences africaines et américaines et 10 pour les séquences asiatiques).

Pour le gène *cox1* (Figure 10), deux séquences présentent un polymorphisme (séquences des cysticerques 26 et 27 du porc n°5 du Mexique). Les deux séquences du porc n°5 présentent 3 sites nucléotidiques variables (G757, G837 et C963) qui correspondent aux mêmes que ceux de la séquence de référence de Mexico et de celle du Cameroun. La séquence du Brésil présente ces 3 nucléotides avec un autre nucléotide variable (G1505). Les 36 autres séquences mexicaines ont la même séquence nucléotidique que celle de Tanzanie.

Pour le gène *cytb* (Figure 11), les 2 séquences du porc n°5 présentent également 3 sites nucléotidiques variables C340, G543 et A546, que l'on retrouve également dans la séquence de référence de Mexico. Ces 3 variations sont également observées dans les séquences du Brésil et du Cameroun mais elles se différencient avec 2 autres sites nucléotidiques variables. Les 8 séquences du porc n°2 (cysticerques n°10 à 17), identiques à celle d'Equateur, possèdent 4 sites nucléotidiques (G543, A546, G672 et G914) qui permettent de les différencier des autres séquences.

Les signatures nucléotidiques déterminées lors des analyses de Madagascar et du Cameroun sont retrouvées ici. Les gènes *cox1* et *cytb* possèdent 12 sites nucléotidiques chacun qui permettent de distinguer les 2 génotypes de *T. solium*.

Ces signatures sont très conservées au sein des séquences de *T. solium*. Nous les avons identifiées sur 38 séquences mexicaines et 13 séquences camerounaises ainsi que sur les 10 séquences de référence. Le nucléotide en position 651 ne peut être utilisé pour les séquences de Madagascar du fait de la mutation de la séquence de Mahajanga. Nous avons obtenu seulement 6 positions nucléotidiques pour le gène *cox1* sur les séquences de Madagascar. Cette analyse a été réalisée sur un fragment de 984pb comparé à la totalité du gène de 1620pb analysée pour les autres séquences.

```

11111111111
11224667788889901334445566
5989465692503666966063680900
6699383603777173454208635978
Mexico 1 GATATGAGATACAAGTGTAAACCGCTGG
Mexico 2 .....
Mexico 3 .....
Mexico 4 .....
Mexico 5 .....
Mexico 6 .....
Mexico 7 .....
Mexico 8 .....
Mexico 9 .....
Mexico 10 .....
Mexico 11 .....
Mexico 12 .....
Mexico 13 .....
Mexico 14 .....
Mexico 15 .....
Mexico 16 .....
Mexico 17 .....
Mexico 18 .....
Mexico 19 .....
Mexico 20 .....
Mexico 21 .....
Mexico 22 .....
Mexico 23 .....
Mexico 24 .....
Mexico 25 .....
Mexico 26 .....G.G..C.....
Mexico 27 .....G.G..C.....
Mexico 28 .....
Mexico 29 .....
Mexico 30 .....
Mexico 31 .....
Mexico 32 .....
Mexico 33 .....
Mexico 34 .....
Mexico 35 .....
Mexico 36 .....
Mexico 37 .....
Mexico 38 .....
Mexico .....G.G..C.....
Cameroon .....G.G..C.....
Brazil .....G.G..C.....G...
Ecuador C.....T.....
Tanzania .....
India ..C..AG.GC...GA.ACCGG.TA.C.A
Thailand ..C.CAG.GC...GA.ACCGG..A.CAA
China 2 ..C..AG.GC...GA..CCGG..A.C.A
China 1 ..C..AG.GC...GA..CCGGT.A.C.A
Irian Jaya .GCG..GAGC...GA..CCGG....C.A

```

Figure 10: Sites polymorphiques des séquences du Mexique pour le gène *cox1* obtenus avec le logiciel Seqout.

```

1112222233344455555666677999
16996691467724814603446157929014
69678979947810447285361212398346
Mexico 1 CTGAGGTGCTTTGGGGTCAAGTCCCAACGAG
Mexico 2 .....
Mexico 3 .....
Mexico 4 .....
Mexico 5 .....
Mexico 6 .....
Mexico 7 .....
Mexico 8 .....
Mexico 9 .....
Mexico 10 .....GA...G...G.
Mexico 11 .....GA...G...G.
Mexico 12 .....GA...G...G.
Mexico 13 .....GA...G...G.
Mexico 14 .....GA...G...G.
Mexico 15 .....GA...G...G.
Mexico 16 .....GA...G...G.
Mexico 17 .....GA...G...G.
Mexico 18 .....
Mexico 19 .....
Mexico 20 .....
Mexico 21 .....
Mexico 22 .....
Mexico 23 .....
Mexico 24 .....
Mexico 25 .....
Mexico 26 .....C.....GA.....
Mexico 27 .....C.....GA.....
Mexico 28 .....
Mexico 29 .....
Mexico 30 .....
Mexico 31 .....
Mexico 32 .....
Mexico 33 .....
Mexico 34 .....
Mexico 35 .....
Mexico 36 .....
Mexico 37 .....
Mexico 38 .....
Cameroon T.....C.....C.....GA.....
Brazil .....C.....C.....GA.....A
Mexico .....C.....GA.....
Tanzania .....C.....T..A.....
Ecuador .....GA...G...G.
India .G.G.A...C..A.AA.C..GACTTTGG.A.A
Thailand .G.G.A...C..A..A.C..GACTTTGGTA.A
China 2 .G.GAA.A.C..A..AAC.GGACTTTGG.A.A
China 1 .G.G.A.A.C..A..ATC.GGACTTTGG.A.A
Irian jaya .GT..A..TC.CA..A.C..GACTTTGG.A.A

```

B.

Figure 11: Sites polymorphiques des séquences du Mexique pour le gène *cytb* obtenus avec le logiciel Seqout.

2.2 La phylogéographie

Chaque pays a fait l'objet d'une analyse phylogénétique distincte pour étudier le positionnement des séquences. Une étude combinée a ensuite été réalisée afin d'apporter un maximum d'information (combinaison des gènes et nombre de séquences). Les trois méthodes décrites précédemment ont été utilisées mais nous présenterons uniquement les résultats obtenus avec la méthode des distances et celle du maximum de vraisemblance (ML). Les arbres obtenus avec la méthode de parcimonie se trouvent en annexe (Annexes 1 à 7).

a. A Madagascar

Les arbres phylogénétiques basés sur les séquences *cox1* et *cytb* de *T. solium* isolés à Madagascar sont tous concordants. La force des nœuds, indiquée par les valeurs de bootstrap, est légèrement meilleure pour les arbres phylogénétiques construits avec la méthode du maximum de vraisemblance (Figures 12A & 13A) que pour ceux construits avec la méthode des distances (Figures 12B & 13B). Tous les arbres phylogénétiques mettent en évidence deux groupes, correspondant aux génotypes de *T. solium*, asiatique et africain/américain. Le groupe africain/américain inclut 3 séquences d'Amérique latine (Brésil, Equateur et Mexique), 2 séquences d'Afrique (Tanzanie et Cameroun) et 2 séquences de *T. solium* collectés à Toliara dans le sud de Madagascar. Le groupe asiatique se compose de séquences de *T. solium* de Chine, d'Inde, d'Indonésie (Irian Jaya) et de Thaïlande associées avec 11 séquences collectées dans différentes régions géographiques de Madagascar.

Au sein du groupe africain/américain, les séquences *cytb* de *T. solium* de Toliara (Figures 13 A & B) sont groupées avec la séquence d'Equateur (valeurs de bootstrap = 97% (ML) et 92% (distance)) alors que les séquences *cox1* de Toliara forment un cluster distinct des autres séquences d'Afrique et d'Amérique (valeurs de bootstrap = 100% (Figures 12 A & B)).

Les séquences *cox1* d'Indonésie (Irian Jaya) et de Chine enracinent les séquences d'Inde, de Thaïlande et de Madagascar. Un résultat similaire est observé avec l'arbre *cytb* basé sur la méthode des distances. La séquence *cytb* de *T. solium* collecté à Mahajanga (Ouest de Madagascar) est clairement associée avec le reste des séquences asiatiques sur l'arbre du maximum de vraisemblance.

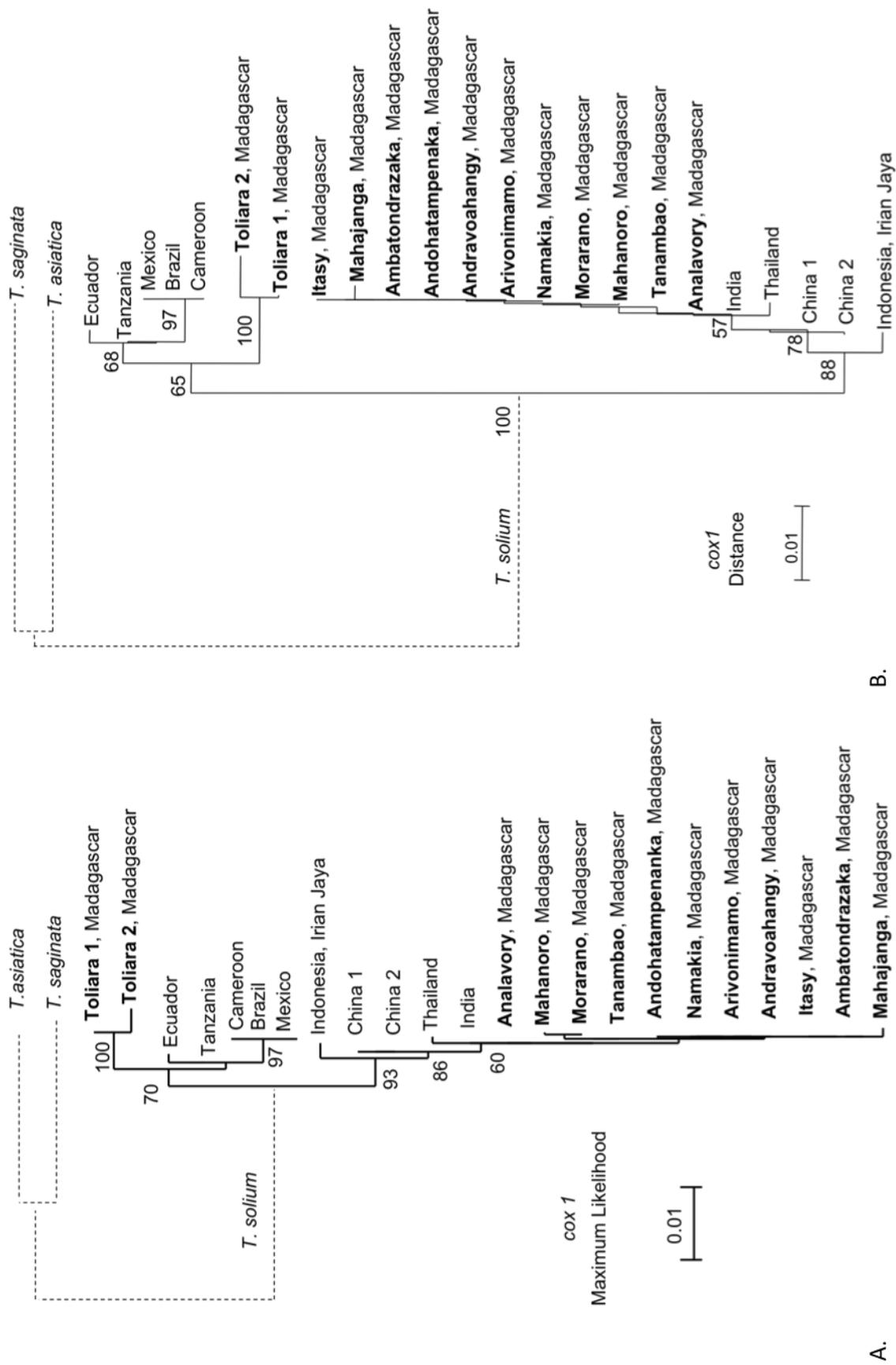


Figure 12: Arbre *cox1* du maximum de vraisemblance (A) et des distances (B) de *T. solium* de Madagascar

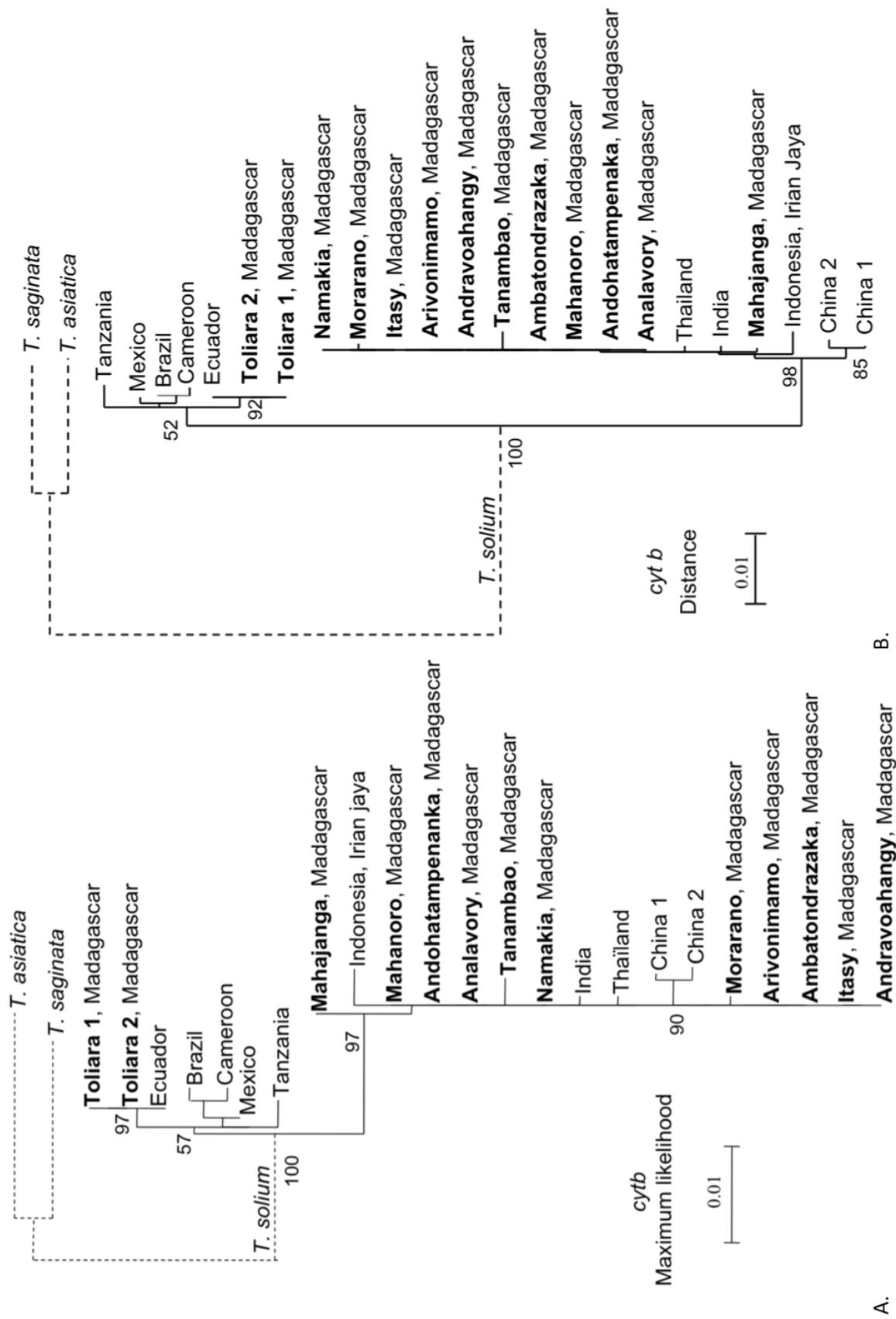


Figure 13: Arbre *cytb* du maximum de vraisemblance (A) et des distances (B) de *T. solium* de Madagascar

L'analyse des gènes concaténés confirme les résultats précédemment obtenus. Les 2 séquences de Toliara sont enracinées par la séquence d'Equateur et forment un groupe avec des valeurs de bootstrap de 100% avec la méthode du maximum de vraisemblance et avec la méthode des distances (Figures 14 A & B). Les séquences du Brésil, du Cameroun et du Mexique forment un groupe avec des valeurs de bootstrap de 97% (ML) et 96% (distance), qui est enraciné par la séquence de Tanzanie. Ces deux clusters de 3 séquences sont soutenus par des valeurs de bootstrap un peu plus faible de 73% (ML) et 80% (distance).

Pour le génotype asiatique, les séquences de Chine forment un cluster avec des valeurs de bootstrap de 95% (ML) et 85% (distance) (Figures 14 A & B). Toutes les séquences d'origine asiatique forment un groupe enraciné par la séquence d'Indonésie. Les séquences d'Inde et de Thaïlande sont les plus proches des séquences de Madagascar.

b. Au Cameroun

Les arbres phylogénétiques ont été construits selon les deux méthodes (distance et maximum de vraisemblance) pour les deux gènes *cox1* et *cytb* ainsi que pour les 2 gènes concaténés. Tous les arbres obtenus (Figures 15, 16 & 17) sont en adéquation. Les séquences du Cameroun ne présentant aucun polymorphisme, nous les avons regroupées sous une seule séquence pour faciliter la lecture des arbres.

Les deux génotypes de *T. solium* sont clairement mis en évidence avec des valeurs de bootstrap de 100%.

Au sein du groupe asiatique, la séquence indonésienne (Irian jaya) enracine les autres séquences. Les séquences *cox1* de Thaïlande et d'Inde forment un groupe avec des valeurs de bootstrap de 68% (distance) et 66% (ML) (Figures 15 A & B) tandis qu'un autre groupe est formé par les séquences *cytb* de Chine (valeurs de bootstrap de 89% pour les 2 techniques). L'analyse combinée des 2 gènes apporte des précisions sur les relations entre les autres séquences. Les 2 séquences de Chine forment un groupe avec des valeurs de bootstrap de 93% avec les deux méthodes (Figures 17 A & B). Le second groupe formé par les séquences de Thaïlande et d'Inde est supporté par des valeurs de 68% (distance) et 73% (ML). Ces deux clusters sont supportés par des valeurs de bootstrap de 95% (distance) et 94% (ML) dans l'analyse combinée.

L'analyse des séquences de *cytb* apporte plus d'informations pour les séquences africaines et américaines. Les séquences du Mexique, du Cameroun et du Brésil forment un groupe supporté par des valeurs de bootstrap de 61% (distance) et 60% (ML) (Figures 16 A & B). Ces valeurs atteignent 96% avec les deux méthodes d'analyse quand les 2 gènes sont combinés. Les séquences camerounaises semblent plus proches des séquences brésiliennes mais les valeurs de bootstrap sont plus modérées : 66% (distance) et 67% (ML).

La distinction entre les 2 génotypes est de nouveau confirmée par cette analyse. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de variations génétiques entre les différents échantillons camerounais, que ce soit d'origine géographique différente ou de différentes localisations anatomiques des cysticerques chez le porc.

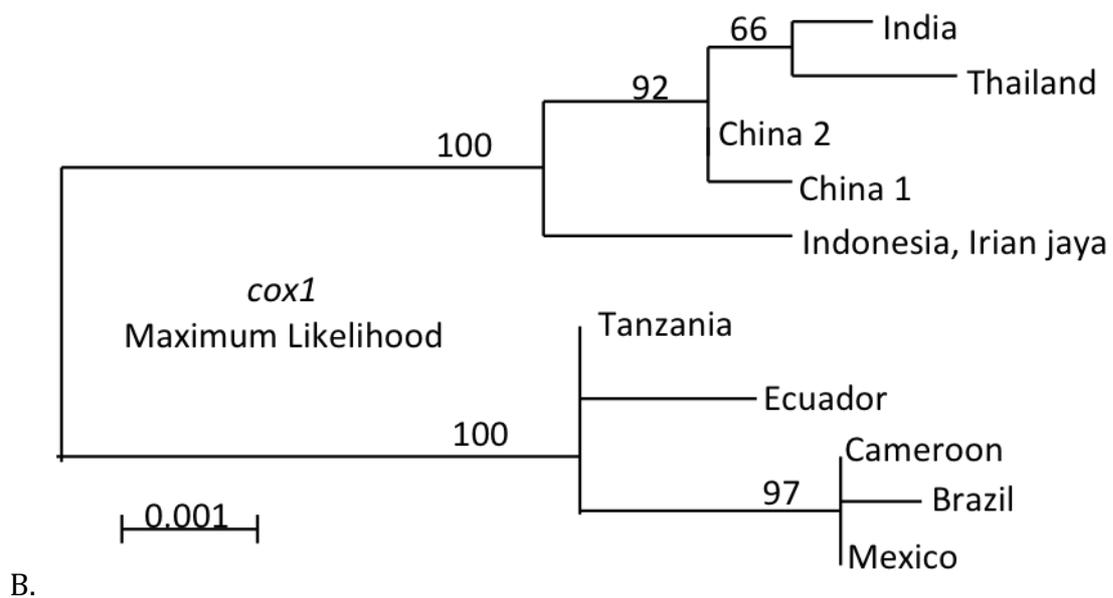
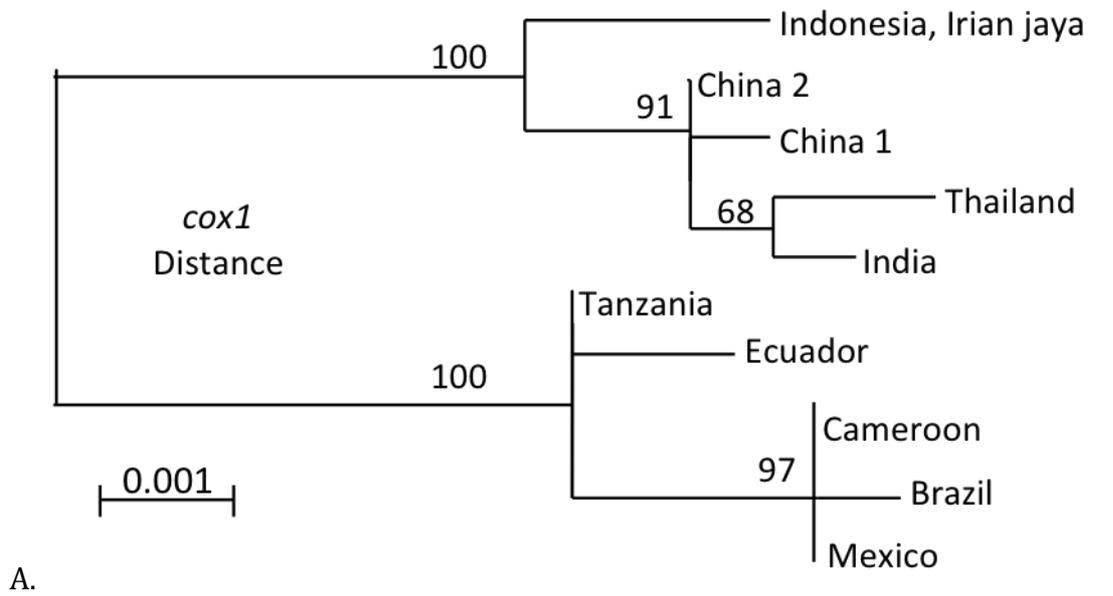


Figure 15: Arbres *cox1* des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de *T. solium* du Cameroun

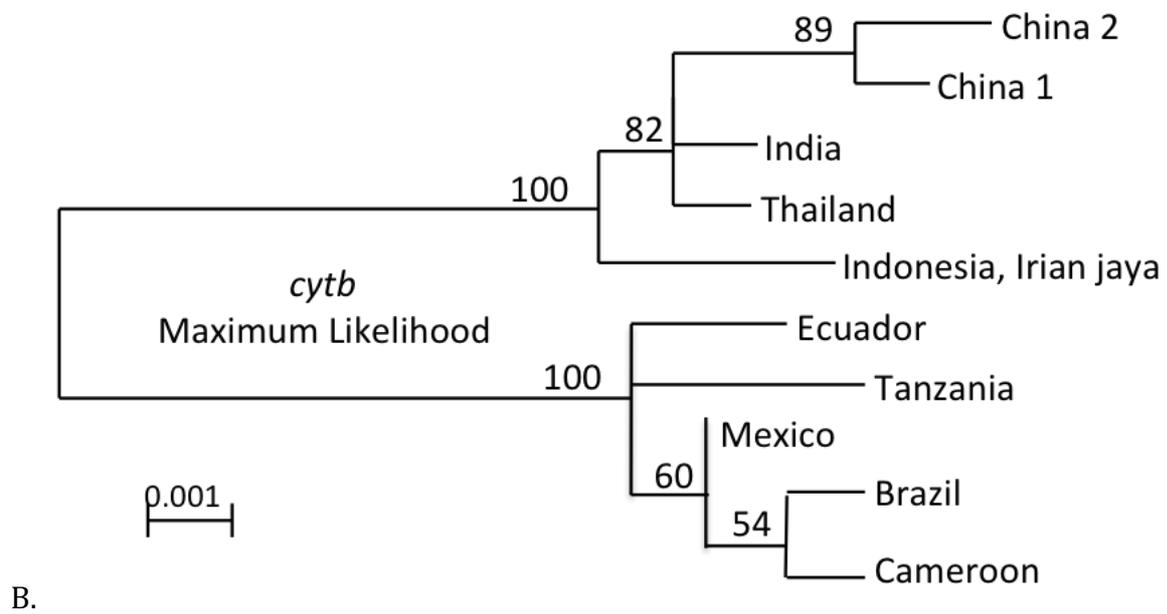
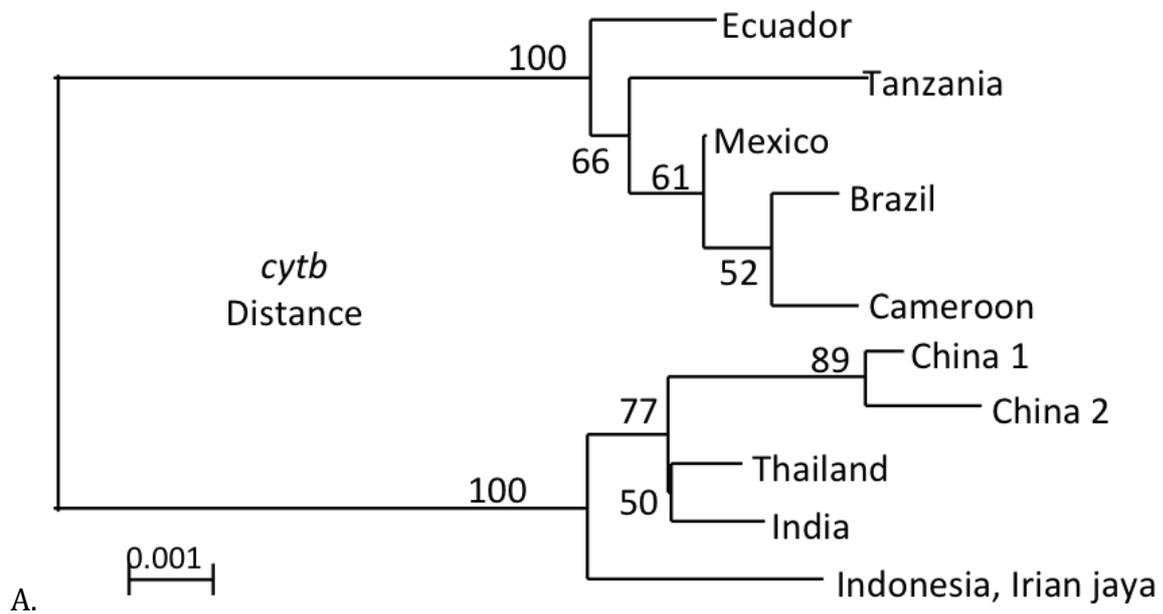
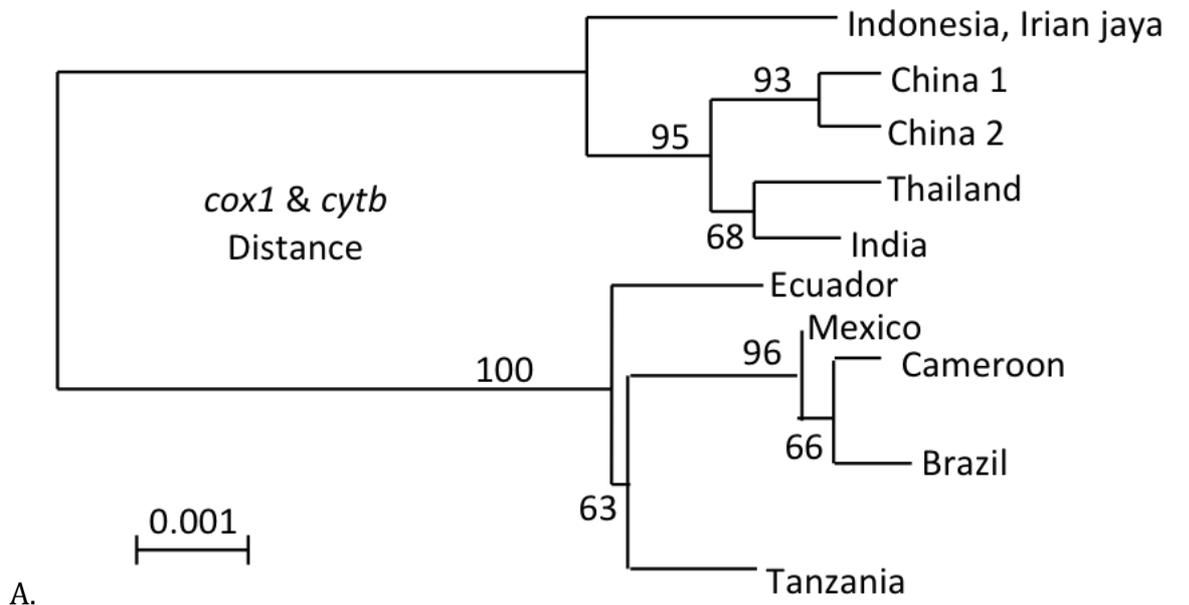
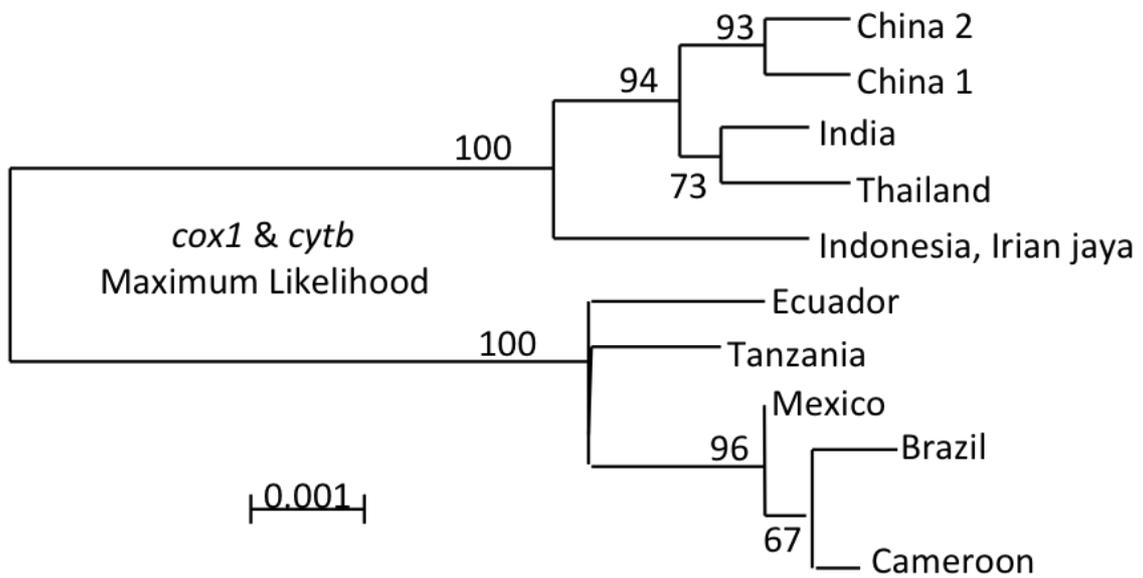


Figure 16: Arbres *cytb* des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de *T. solium* du Cameroun



A.



B.

Figure 17: Arbres des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) pour les 2 gènes concaténés de *T. solium* du Cameroun

c. Au Mexique

Les arbres phylogénétiques construits à partir des séquences *cox1* sont moins informatifs (Figures 18 A & B). Les 2 séquences du porc n°5 forment un groupe avec les séquences de référence du Mexique, du Cameroun et du Brésil (valeurs de bootstrap 97% pour les 2 méthodes). Toutes les autres séquences ne peuvent pas être distinguées les unes des autres quelle que soit la méthode utilisée.

L'analyse des séquences *cytb* permet d'obtenir plusieurs groupes (Figures 19 A & B). Les séquences du porc n°5 sont groupées avec la séquence de référence du Mexique et enracent les séquences du Cameroun et du Brésil (valeurs de bootstrap 58% (distance) et 60% (ML)). Toutes les séquences du porc n°2 forment un groupe avec la séquence d'Equateur (valeurs de bootstrap 86% pour les 2 méthodes). La séquence de Tanzanie enracine toutes les autres séquences du Mexique (valeurs de bootstrap 78% (distance) et 77% (ML)).

L'étude des 2 gènes concaténés permet d'affiner l'analyse. Les résultats obtenus avec la méthode des distances (Figure 20A) et celle du maximum de vraisemblance (Figure 20B) sont très similaires. Le cluster des séquences d'Equateur et du porc n°2 est supporté par des valeurs de bootstrap de 78% pour les 2 méthodes ; celui du Brésil, du Cameroun et des séquences du porc n°5 avec la séquence de référence du Mexique a des valeurs de bootstrap de 91% (distance) et 93% (ML). Les séquences du Brésil et du Cameroun forment un sous groupe avec des valeurs de bootstrap de 71% pour les 2 méthodes.

La séquence indonésienne enracine toutes les autres séquences asiatiques qui sont séparées en 2 clusters : Chine (valeurs de bootstrap 95% (distance) et 91% (ML)) et Thaïlande et Inde (valeurs de bootstrap 68% (distance) et 76% (ML)).

Nous n'avons pas identifié de variations de séquence permettant de déterminer l'origine anatomique des cysticerques en analysant ces gènes mitochondriaux. Les deux cysticerques du porc n°5 ont été prélevés dans le cerveau. Nous ne disposons pas d'autres cysticerques provenant de ce porc. On ne peut donc pas conclure à une signature spécifique de la localisation cérébrale. Les prélèvements effectués chez les porcs n°1 et n°3 proviennent de localisation cérébrale et musculaire et ne montrent pas de différences en fonction de l'origine anatomique du prélèvement.

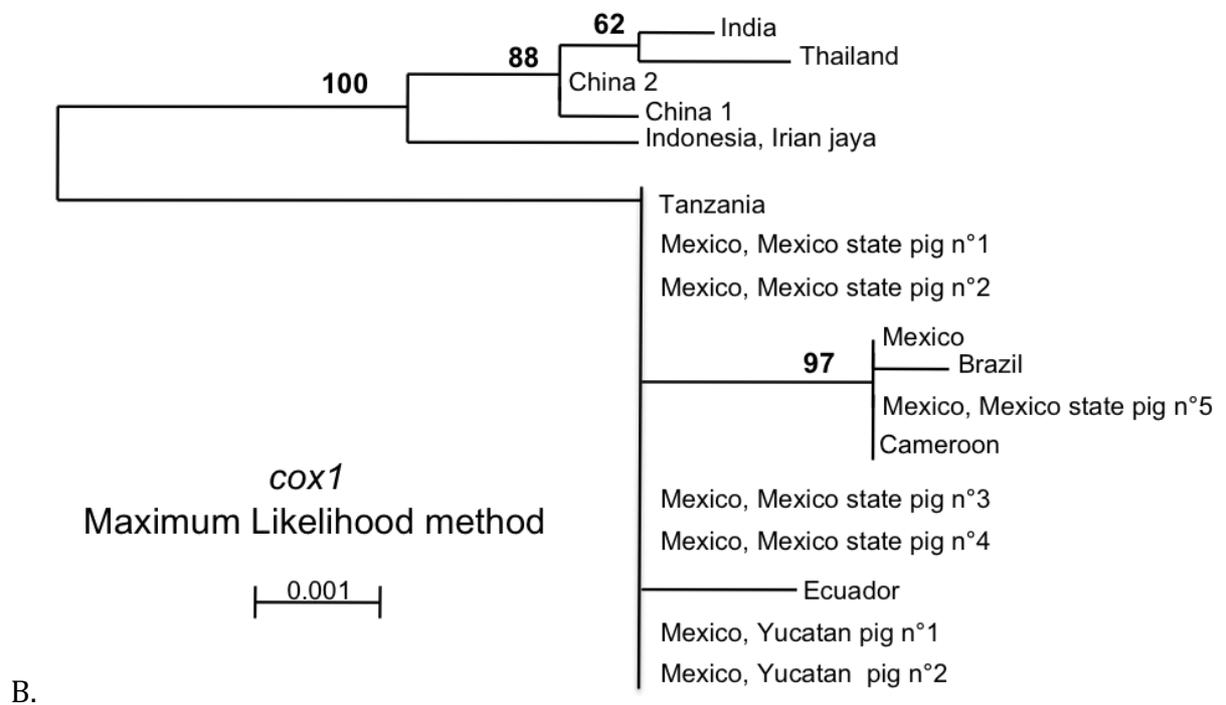
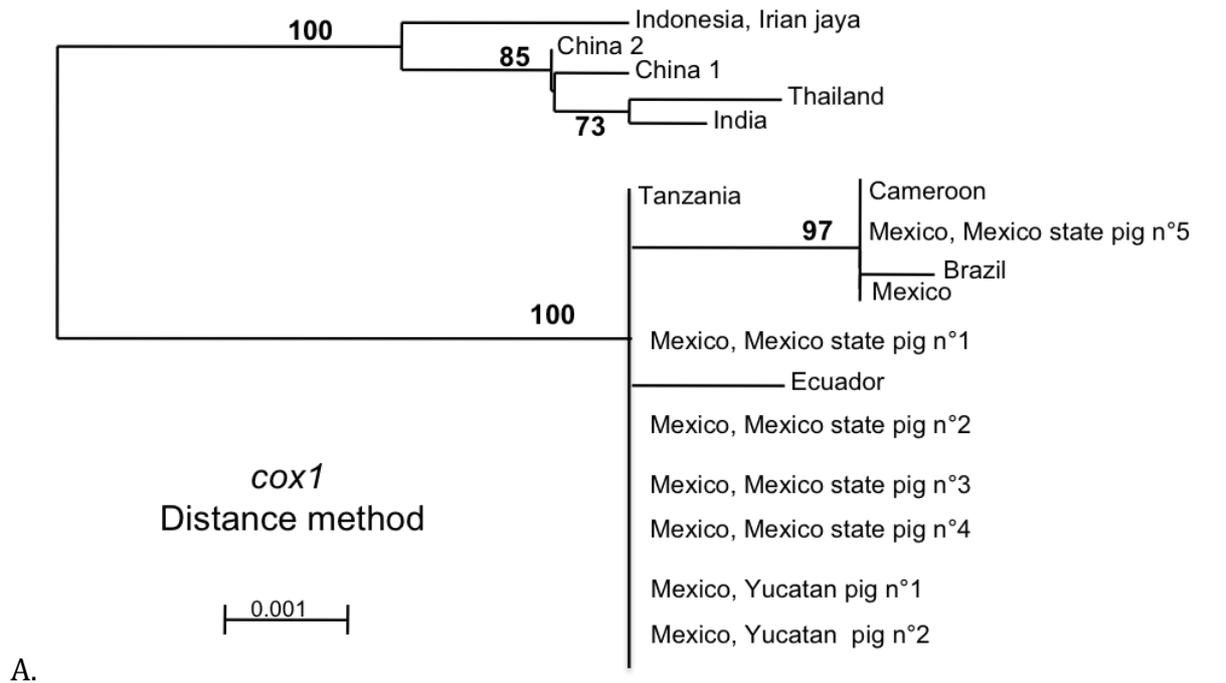


Figure 18: Arbres *cox1* des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de *T. solium* du Mexique

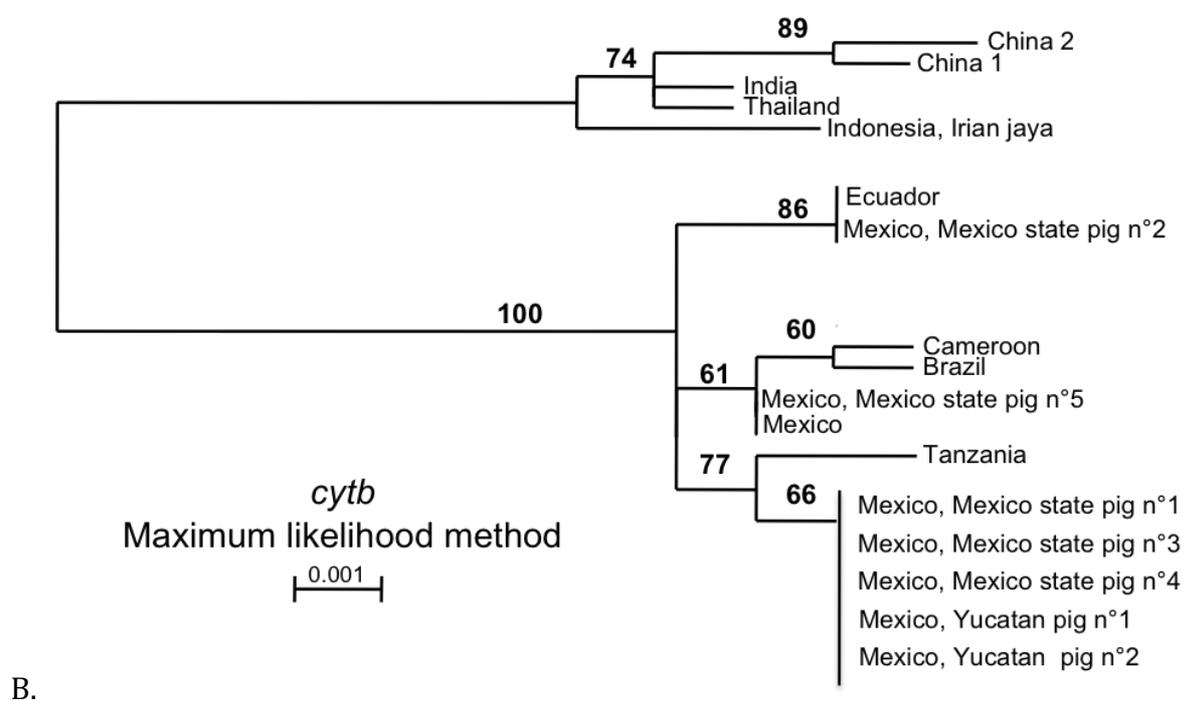
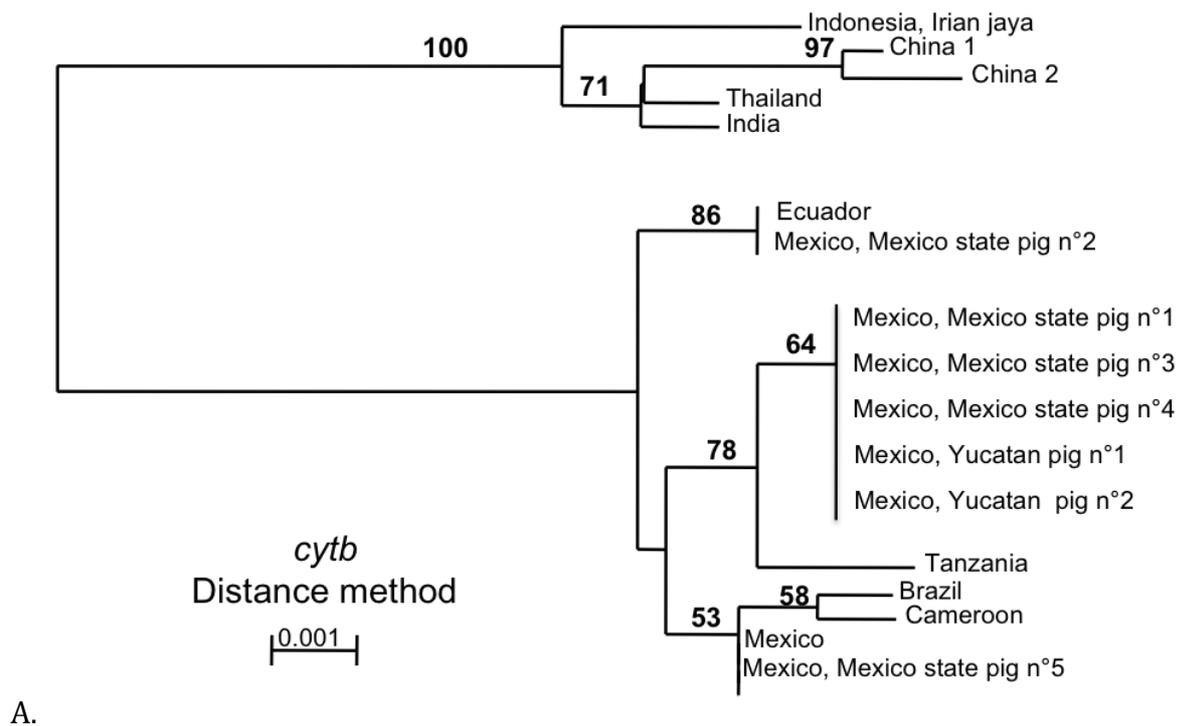
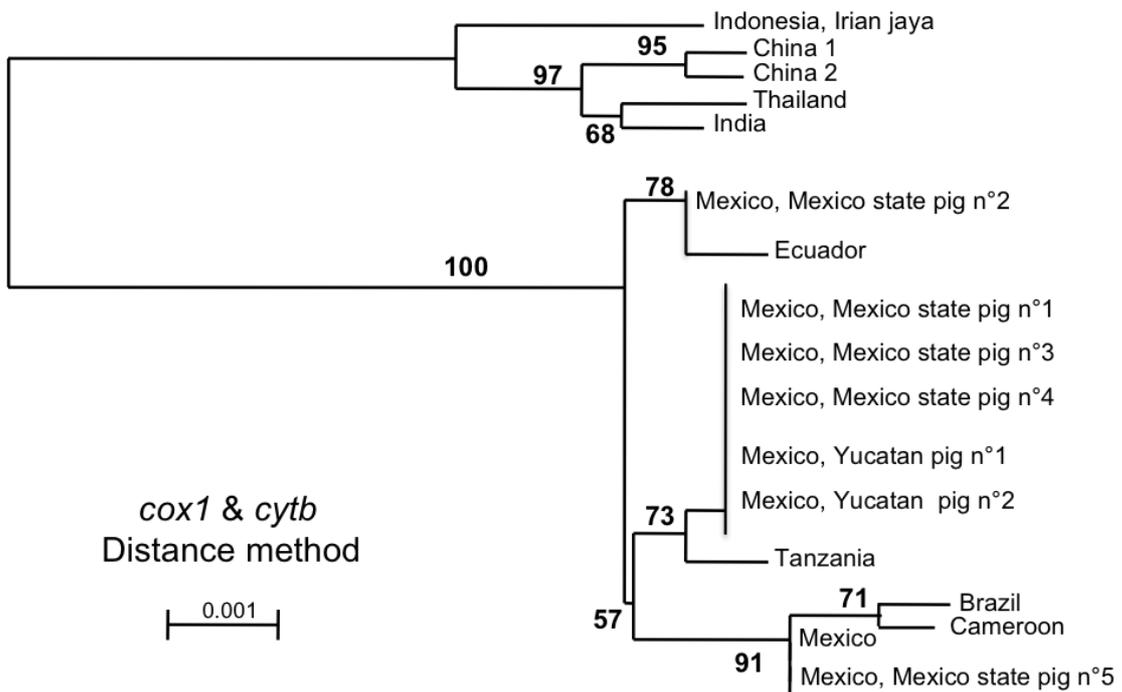
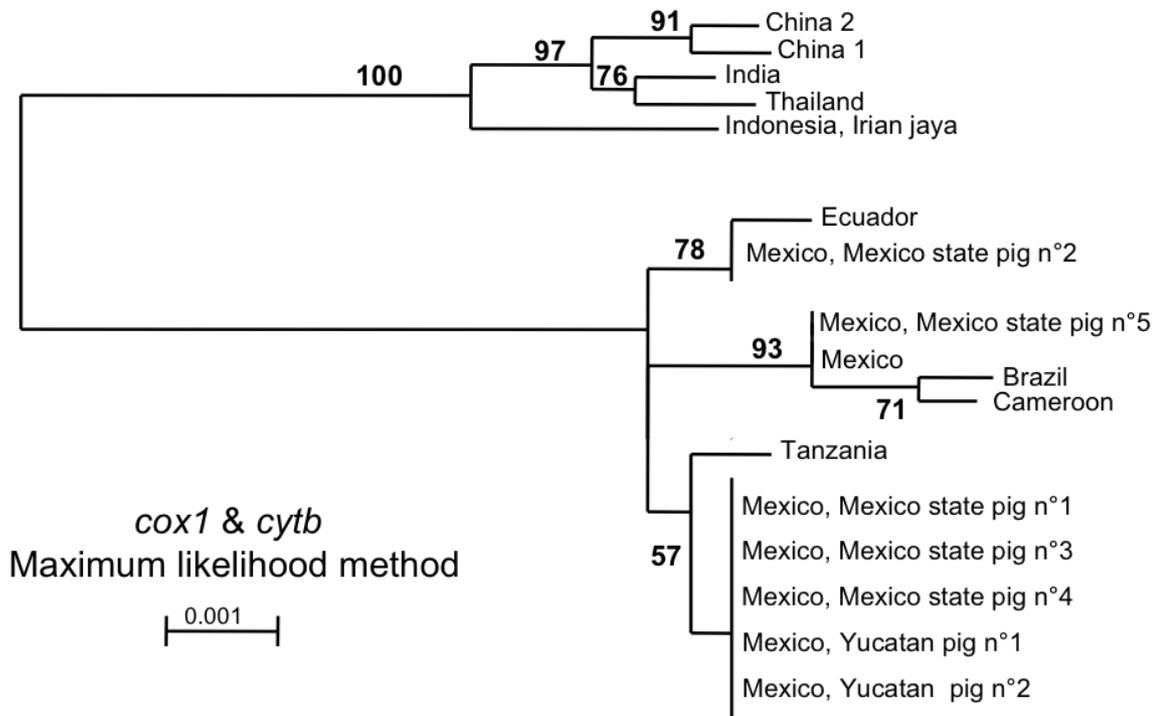


Figure 19: Arbres *cytb* des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de *T. solium* du Mexique



A.



B.

Figure 20: Arbres des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de *T. solium* du Mexique pour les 2 gènes concaténés

d. L'analyse combinée des séquences de *T. solium*

Pour cette analyse, les séquences ne présentant aucun polymorphisme ont été regroupées pour clarifier l'arbre obtenu. Pour les séquences mexicaines, 8 séquences du porc n°2 ont été regroupées ainsi que les 2 séquences du porc n°5, les 3 séquences du Yucatan, et 25 séquences correspondant aux séquences des porcs n°1, n°3 et n°4. Les séquences camerounaises ont été regroupées selon leur origine géographique (9 séquences de la province Extrême Nord et 3 de la province Ouest).

La pertinence de la phylogénie est augmentée avec le nombre de séquences et le nombre de gène étudié. Nous présentons ici les arbres phylogénétiques non enracinés obtenus avec la totalité de nos séquences basés sur l'analyse des 2 gènes concaténés avec la méthode des distances (Figure 21) et celle du maximum de vraisemblance (Figure 22).

Les deux groupes correspondant aux 2 génotypes de *T. solium* sont clairement identifiés soutenus par des valeurs de bootstrap de 100% pour les 2 techniques utilisées.

Le groupe asiatique comporte au final 16 séquences dont 5 de référence. La séquence d'Indonésie (Irian jaya) enracine la totalité des autres séquences d'Asie. Les séquences malgaches, la séquence d'Inde et de celle de Thaïlande forment un groupe avec des valeurs de bootstrap de 66% (distance) et 63% (ML).

Le groupe africain/américain est composé au total de 58 séquences dont 5 séquences de référence, seules 11 séquences sont représentées sur l'arbre. Les 8 séquences du porc n°2 forment un groupe avec la séquence d'Equateur et les 2 séquences de Toliara avec des valeurs de bootstrap de 69% (distance) et 72% (ML). Un second groupe est formé par la séquence de Tanzanie, les 3 séquences du Yucatan, et 25 séquences de l'état de Mexico (correspondant aux séquences des porcs n°1, n°3 et n°4). La séquence de Tanzanie enracine ce groupe avec des valeurs de bootstrap de 80% (distance) et 66% (ML). Le dernier groupe se compose des 13 séquences du Cameroun, des 2 séquences de l'état de Mexico (porc n°5) et des séquences de référence du Mexique, du Cameroun et du Brésil. Ce groupe de 18 séquences est supporté par des valeurs de bootstrap de 92% (distance) et 93% (ML). Les séquences du Cameroun sont enracinées par la séquence du Brésil avec des valeurs de bootstrap de 69% (distance) et 67% (ML).

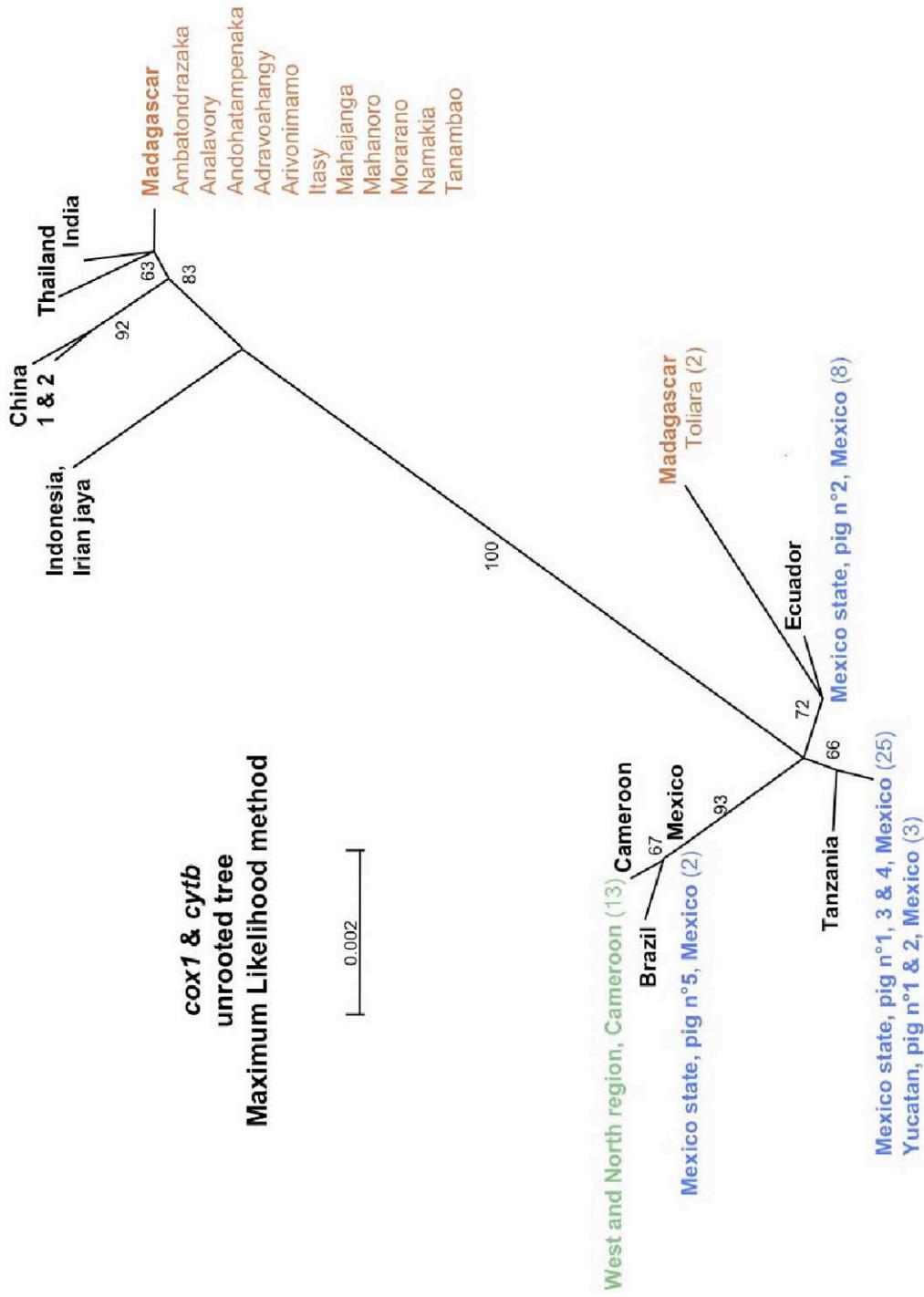


Figure 22: Arbre non enraciné du maximum de vraisemblance des séquences de *T. solium* de Madagascar, du Cameroun et du Mexique avec les séquences de référence.

2.3 L'origine biogéographique de *T. solium*

Nous avons utilisé les données de *cox1* et *cytb* séparément pour faire une approximation des dates de divergence des différents sous-groupes (Tableau 6). Les dates estimées avec les deux gènes sont en accord. Les séquences *cox1* sont utiles pour l'approximation des dates de divergence des souches de *T. solium* collectés à Toliara. Les autres dates de divergence ont été obtenues à partir de l'analyse du gène *cytb*. Les résultats de cette analyse, ainsi que les intervalles de confiance à 95%, sont indiqués dans le Tableau 6 et la Figure 23. Cette analyse a été effectuée uniquement avec les séquences de Madagascar et les séquences de référence.

La date de divergence entre *T. saginata* et *T. asiatica* a été recalculée selon notre modèle et estimée à 0,917 Ma [0,246 - 1,638]. Cette date est comprise dans l'intervalle déterminé par Hoberg de 0,78 à 1,71 Ma.

Taenia solium a divergé en 2 géotypes dépendant de la localisation géographique il y a 0,678 Ma [0,271 - 1,327]. La divergence au sein des sous-groupes africain/américain et asiatique s'est produite à la même époque, il y a environ 235 000 ans [48 660 – 518 000] et 262 000 ans [85 860 – 540 000] respectivement.

Les 2 séquences de Chine ont divergé il y a environ 181 000 ans [62 590 – 352 000] tandis que les deux clusters Equateur-Toliara et Brésil-Mexique se sont formés il y a environ 151 000 ans [32 520 – 318 000].

Les spécimens collectés à Toliara, au Sud Ouest de Madagascar, ont divergé plus récemment (84 280 ans [41 000 – 217 000]). Les séquences d'Inde, de Thaïlande et 10 séquences de Madagascar ont divergé des autres séquences asiatiques il y a environ 85 690 ans [25 820 – 165 000].

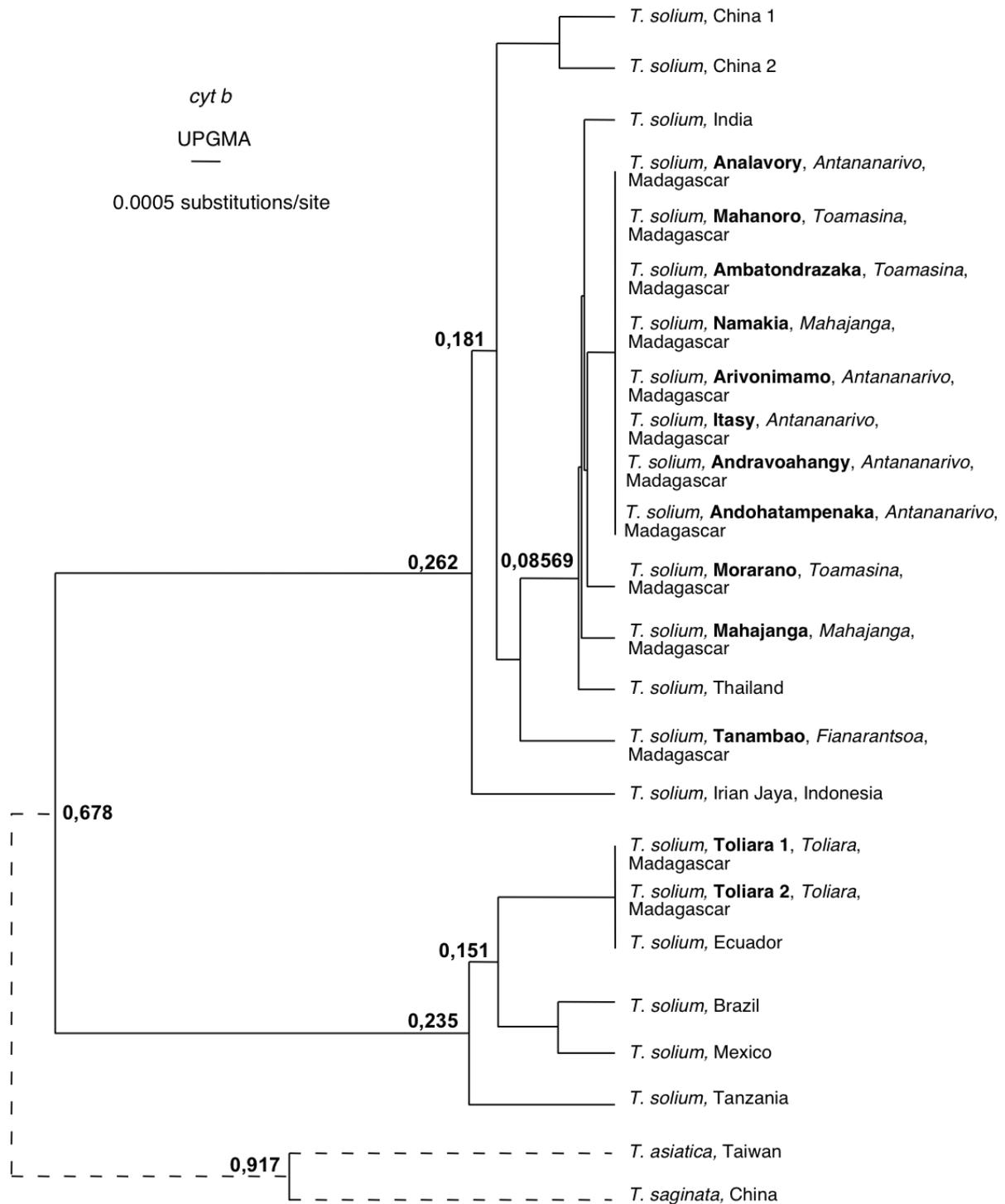


Figure 23: Arbre UPGMA *cyt b* indiquant l'estimation des dates de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) en Ma, calculées avec BEAST. Les pointillés ne respectent pas l'échelle.

Tableau 6: Date de divergence avec les intervalles de confiance à 95% de 8 sous groupes (* date obtenue avec le gène *cox1*). Les données du tableau pour les *Suiformes* et les humains ont été obtenus de travaux antérieurs (Dewar et Wright, 1993 ; Giuffra et al., 2000 ; Hoberg, 2006 ; Larick et Ciochon, 1996 ; Larson et al., 2007b ; Mona et al., 2007).

Période géologique	Date (Ma)	Diversification phylogénétique	Date de divergence BEAST en Ma (IC 95 %)	Suiformes	Hommes
Pliocène	1,7 - 5,3			<i>Suinae / Phacochoerus</i>	Emergence d' <i>Homo</i> <i>H. erectus</i> (émergence africaine 1.9)
Pléistocène inférieur	0,78 - 1,7			<i>Sus / Potamochoerus</i>	
		<i>T. saginata / T. asiatica</i>	0,917 (0,246 - 1,638)	<i>P. larvatus / P. porcus</i>	<i>H. erectus</i> (arrivée en Asie 0.7)
		<i>T. solium</i>	0,678 (0,271 - 1,327)	<i>S. scrofa / S. barbatus</i>	<i>H. sapiens</i> (émergence africaine 0.2)

Pléistocène moyen	0,78-0,13	Asie	0,262 (0,08586 - 0,54)	<i>S. scrofa</i> : lignée asiatique	<i>H. sapiens</i> (dispersion en Eurasie)
		Afrique	0,235 (0,04866 - 0,518)		

Pléistocène supérieur	0,13-0,01	Chine / reste de l'Asie	0,181 (0,06259 - 0,352)		
		Amérique du Sud	0,151 (0,03252 - 0,318)		
Holocène	- 0,01	Inde - Thaïlande - Madagascar	0,08569 (0,02582 - 0,165)	Coexistence de nombreuses espèces de <i>Sus</i> en Asie du Sud Est	Preuve que les espèces de <i>Sus</i> étaient couramment mangées en Asie
		Madagascar (Tollara)	0,08428 (0,041 - 0,217)*		Peuplement de Madagascar et import de porcs
					Domestication des porcs (9000)

3. Discussion

Nous avons montré la présence de polymorphisme entre les isolats de *T. solium* au sein d'un même pays et entre les pays. Les pays que nous avons étudiés sont tous en zone d'endémie de la cysticercose mais leur situation épidémiologique est différente. Les taux de prévalence de la cysticercose humaine et porcine varient entre ces régions.

Les séquences du Cameroun sont les seules à ne présenter aucun polymorphisme. La variabilité des séquences du Mexique permet de les grouper avec des isolats de différents pays. Les séquences mexicaines ont pu être groupées au sein de 3 clusters différents : avec le Cameroun et le Brésil, avec l'Equateur ou avec la Tanzanie. Cette situation suggère donc plusieurs introductions du parasite sur le territoire mexicain.

Notre étude montre que les souches présentes chez les porcs malgaches proviennent de 2 origines géographiques différentes qui ont émergé il y a environ 250 000 ans. La majorité des spécimens collectés à Madagascar montrent une origine asiatique. Cette situation originale peut être expliquée par l'histoire de cette île.

Le peuplement de Madagascar s'est produit il y a 2 000 ans (Dewar et Wright, 1993). Plusieurs indices viennent corroborer cette estimation : l'apparition d'os d'animaux modifiés par l'homme et les premières observations de pollen de *Cannabis/Humulus* introduit par les populations humaines (Burney et al., 2004). Les premiers habitants étaient probablement des commerçants qui vivaient sur les côtes du fait de leurs activités maritimes (Dewar, 2003). Ces premiers arrivants, d'origine austronésienne, ont migré de Taiwan vers les Philippines, Bornéo et les îles Célèbes il y a 4000 ans (Figure 24). Leur expansion s'est poursuivie plus loin à l'Est jusqu'aux îles Fidji et à la Nouvelle Zélande (de 1200 avant J-C à 800 après J-C) et à l'Ouest jusqu'à Java et Madagascar.

La diversité génétique de *T. solium* à Madagascar doit correspondre à plusieurs importations de porcs de différentes régions d'Asie. La présence de spécimen d'origine africaine suggère également des migrations. Le faible échantillonnage des souches africaines limite l'analyse de l'influence africaine.

La situation de Madagascar est unique. Pour la première fois, les deux géotypes de *T. solium* sont décrits dans un seul et même pays. Madagascar possède toutes les conditions nécessaires à la circulation du parasite.

De nombreux hôtes intermédiaires potentiels circulent sur l'île (Dewar et Wright, 1993 ; Hoberg et al., 2001). *Potamochoerus porcus* est décrit en Afrique de l'Est et centrale et *Potamochoerus larvatus* est largement distribué de l'Ethiopie à l'Afrique du Sud (Roger et al., 2001). La question de l'origine de ces deux espèces à Madagascar reste ouverte. L'absence de trace ancienne de ces espèces suggère une introduction récente par les hommes (Goodman et al., 2003). *Potamochoerus larvatus larvatus* est retrouvé sur la côte Ouest de Madagascar tandis que *P. larvatus hova* est décrit à l'Est de l'île. Ces espèces peuvent être à l'origine de l'introduction du parasite à Madagascar. Leur rôle dans la transmission de *T. solium* ne peut être écarté.

D'autres arguments sont en faveur de l'hypothèse de plusieurs introductions de *T. solium* d'origines variées. La diversité culturelle et phénotypique de l'île est très importante. Des études génétiques humaines ont montré que la fréquence d'une délétion de 9 pb dans l'ADN mitochondrial reflétait des migrations du centre de l'Indonésie et d'Afrique de l'Est (Soodyall et al., 1995). Une étude génétique sur les lignées maternelles et paternelles a montré une contribution africaine et indonésienne quasiment équivalente. Les apports paternels ont pu être attribués à la zone géographique de Bornéo (Hurles et al., 2005). Madagascar tire 66,3 % de son patrimoine génétique d'Afrique cependant un lien entre l'île et l'Asie du Sud-Est est clairement établi (Regueiro et al., 2008).

Les méthodes de culture du riz, les canoës ainsi que des instruments de musique ont une origine asiatique. Cependant on retrouve également des méthodes de culture et d'élevage africaines (Wright et Rakotoarisoa, 2003). De nombreuses observations permettent de relier Madagascar au monde austronésien. La coutume des secondes funérailles (famadihana à Madagascar) est également observée des Philippines à Bornéo (Allibert, 2007).

La répartition des langues préhistoriques qui résulte des migrations ultérieures, apporte des informations sur les comportements du genre *Homo*. Notamment, les langues austronésiennes de l'Océan Pacifique se sont propagées par voie maritime et côtière sur plus de 13 000 km en 1500 ans (Bellwood, 1991). Cette famille de langue était là plus étendue sur Terre jusqu'en 1500 avant notre ère. De nos jours, plus de 200 millions de personnes parlent ces langues à Taiwan, au Sud du Vietnam, à Madagascar, en Malaisie, aux Philippines, en Indonésie et dans les îles du Pacifique.

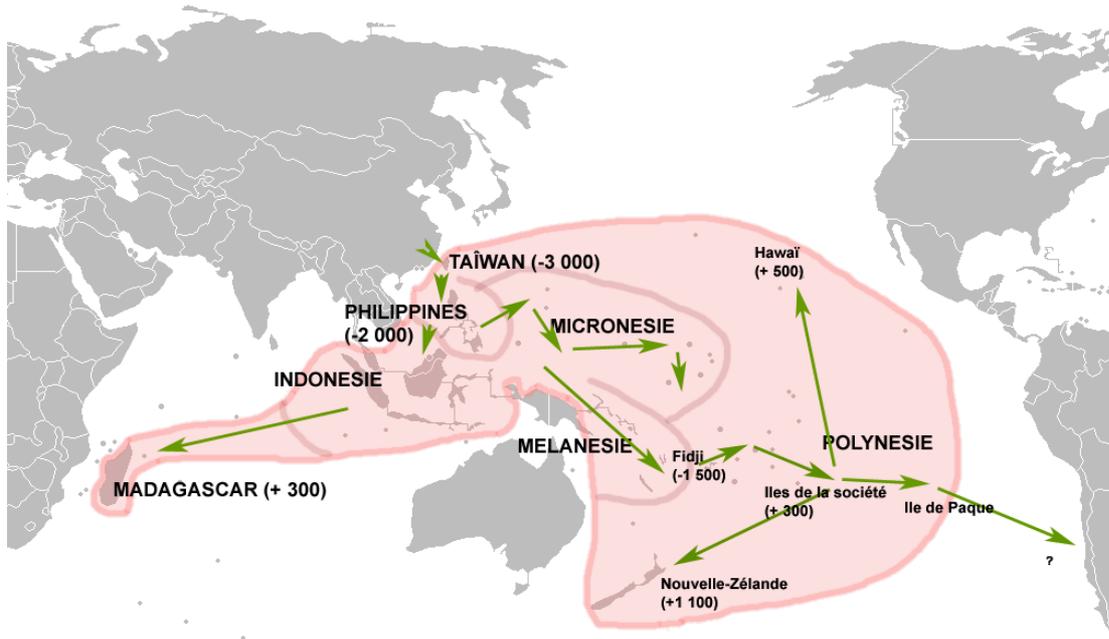


Figure 24: Carte de l'expansion des langues austronésiennes

Basé (avec des compléments) sur l' *Atlas historique des migrations* de Michel Jan, Gérard Chaliand, Jean-Pierre Rageau, Edition Seuil, mars 1999, ISBN 2020132230. Les dates sont tirées des recherches archéologiques. Des divergences entre auteurs sont possibles

Les migrations débutèrent à Taiwan vers la Mélanésie occidentale (Figure 24) puis vers des territoires inhabités tels que Madagascar (Bellwood, 1991). Les locuteurs de l'austronésien étaient principalement des agriculteurs et des utilisateurs de pirogue à voiles. Le malgache dérive des langues austronésiennes mais contient des influences Bantu au niveau de la phonétique et du vocabulaire et également quelques mots malais et javanais (Dewar et Wright, 1993).

Les migrations des populations et l'influence culturelle ont permis une meilleure compréhension de l'histoire de Madagascar et de son peuplement. Nous avons décrit les arguments génétiques, archéologiques, culturels et linguistiques en faveur de la double origine du peuple malgache. Notre étude sur la diversité génétique de *T. solium* vient également corroborer ces affirmations.

II. Histoire évolutive de l'association hôte-parasite

Les taenias sont transmis entre les prédateurs carnivores et leurs proies. Les vers solitaires humains nécessitent deux hôtes pour accomplir leur cycle : un hôte intermédiaire herbivore où se produit une phase asexuée permettant la dispersion du parasite et un hôte définitif carnivore, où la reproduction sexuée a lieu. Les études phylogénétiques nous permettent d'étudier la spéciation des taenias et l'évolution de leurs hôtes.

Nous avons appliqué notre modèle de datation afin d'estimer les dates de divergence des trois espèces de *Taenia* qui parasitent l'homme. La répartition géographique actuelle de *T. saginata* et *T. solium* suggère l'influence de l'hôte définitif dans la dispersion du parasite. Nous avons donc abordé nos résultats en fonction de l'histoire des hôtes afin d'identifier leurs rôles dans la diversification.

1. La divergence des *Taenia* qui parasitent l'homme

Taenia saginata, *T. asiatica* et *T. solium* sont les 3 espèces du genre *Taenia* qui parasitent l'homme. *Taenia solium* a été largement étudié du fait de l'impact de la cysticerose sur les populations humaines et sur les pertes engendrées dans l'élevage des porcs. *Taenia asiatica* est très proche morphologiquement de *T. saginata* et son statut taxonomique est encore débattu. Plusieurs auteurs considèrent *T. asiatica* comme une espèce indépendante (Ito et al., 2003a) tandis que d'autres considèrent que c'est une sous-espèce de *T. saginata* (Fan et al., 2006 ; Galan-Puchades et Fuentes, 2004). Depuis la mise en évidence de *T. asiatica*, l'analyse moléculaire des espèces de *Taenia* a été développée pour permettre leur différenciation, en particulier en Asie (Gonzalez et al., 2004). Notamment, une PCR multiplex et une PCR-RFLP ont été développées afin d'identifier l'espèce de *Taenia* (Yamasaki et al., 2006).

Ces parasites ont un cycle très similaire. Le ver adulte est retrouvé dans l'intestin grêle des humains, hôtes définitifs (Tableau 7). Des différences morphologiques existent et permettent une identification : le scolex armé ou inerme (Eom et Rim, 1993 ; Garcia et Del Brutto, 2000), le nombre de branches utérines de 7 à 12 pour *T. solium*, de 18 à 32 pour *T. saginata* et de 16 à 21 pour *T. asiatica* (Pawlowski, 2002), ainsi qu'une protubérance postérieure sur les proglottis gravides (Eom, 2006).

Les larves cysticerques de *T. saginata* (*Cysticercus bovis*) se localisent dans les muscles des bovins. *Taenia solium* et *T. asiatica* partagent le même hôte intermédiaire mais le tropisme des larves est différent : les muscles des porcs pour *T. solium* (*C. cellulosae*) (Garcia et al., 2003) et les viscères (particulièrement le foie) pour *T. asiatica* (*C. viscerotropica*) (Eom et al., 1992).

Tableau 7: Comparaison des *Taenia* qui parasitent l'homme

		<i>Taenia saginata</i>	<i>Taenia asiatica</i>	<i>Taenia solium</i>
	Hôte définitif	Homme	Homme	Homme
	Localisation	Intestin	Intestin	Intestin
Ver adulte	Scolex	inerte	inerte	armé
	Nombre de branches utérines	18-32	16-21	7-12
	Expulsion	Active	Active	Passive
Metacestodes	Hôte intermédiaire	Bovins	Porcs	Porcs
	Localisation	Muscle	Foie	Muscle
	Répartition	Mondiale	Asie du Sud Est	Mondiale

Taenia solium est une espèce polymorphique qui présente deux génotypes en relation avec l'origine géographique du parasite (Ito et al., 2003b ; Michelet et al., 2010 ; Nakao et al., 2002). *Taenia saginata* présente la même répartition géographique que *T. solium*. Cependant, l'analyse phylogénétique ne révèle aucune diversification qui soit liée aux origines géographiques.

Les estimations de dates de divergence obtenues avec notre modèle sont indiquées dans le Tableau 8 ainsi que sur la Figure 25.

Les séquences de *T. asiatica* et de *T. saginata* sont très proches et semblent avoir divergé approximativement il y a 1,01 Ma [0,414 – 1,616] (Figure 25 et Tableau 8). Ce résultat est en accord avec la date estimée par Hoberg (2001) entre 0,78 et 1,71 Ma. Nous avons estimé cette date à 0,917 Ma [0,24 - 1,64] (Michelet et al., 2010).

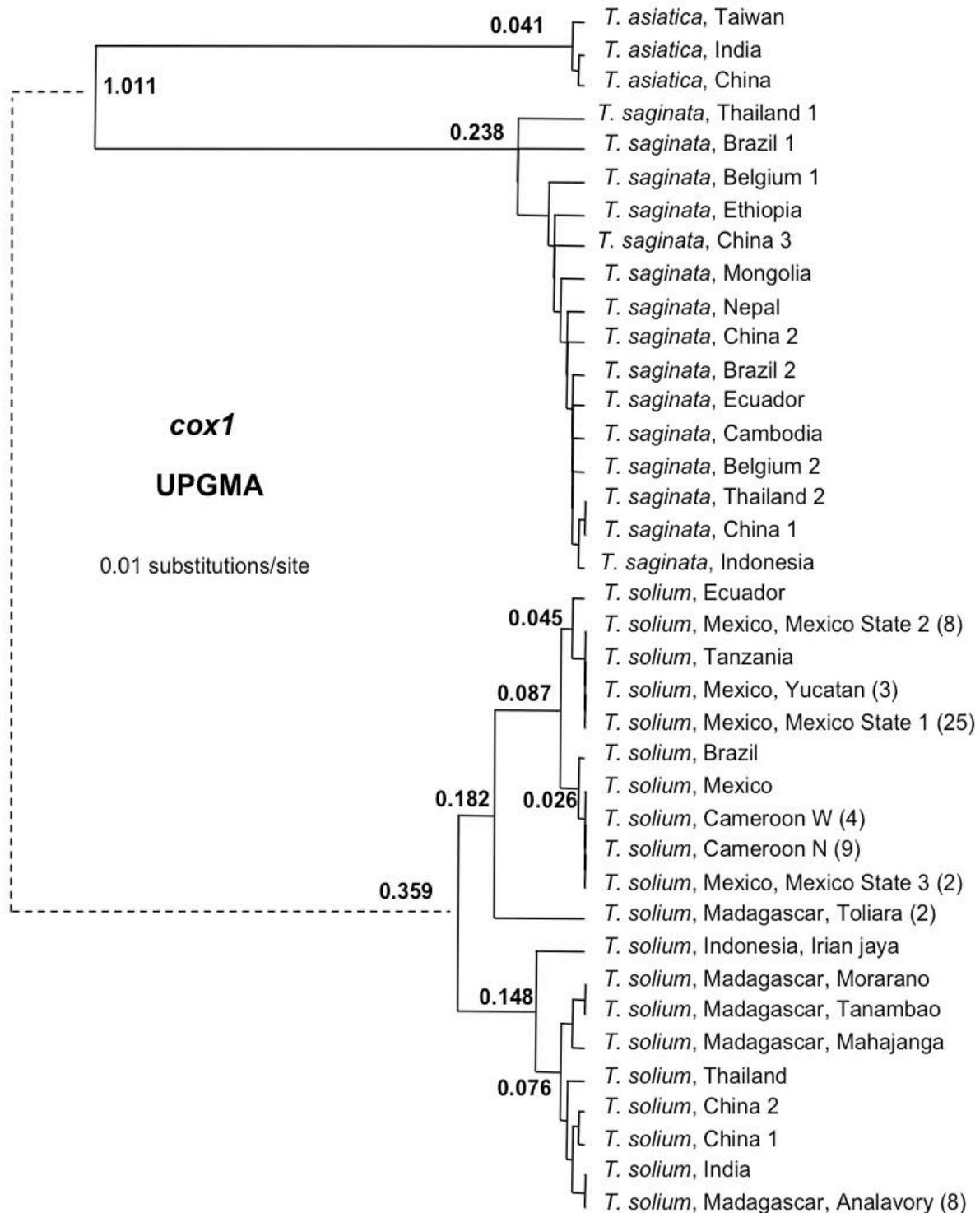


Figure 25: Arbre UPGMA *cox1* indiquant l'estimation des dates de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) en Ma, calculées avec BEAST. Les pointillés ne respectent pas l'échelle.

Tableau 8: Date de l'ancêtre commun le plus récent en million d'années (tMRCA) avec l'intervalle de confiance à 95%.

Groupe	tMRCA (Ma)	IC 95%
<i>T. saginata</i> / <i>T. asiatica</i>	1,011	0,414 - 1,616
<i>T. saginata</i>	0,238	0,1 - 0,426
<i>T. asiatica</i>	0,041	0,0034 - 0,098
<i>T. solium</i>	0,359	0,165 - 0,619
<i>T. solium</i> , génotype Africain/Américain	0,182	0,064 - 0,329
<i>T. solium</i> , génotype Asiatique	0,148	0,051 - 0,279
<i>T. solium</i> , génotype Africain/Américain sans Toliara	0,087	0,028 - 0,16
<i>T. solium</i> , Brésil/Cameroun/Mexique	0,026	0,0042 - 0,056
<i>T. solium</i> , Equateur/Tanzanie/Mexique	0,045	0,0084 - 0,092
<i>T. solium</i> , génotype Asiatique sans l'Indonésie	0,076	0,025 - 0,141
<i>T. solium</i> , Chine	0,027	0,00039 - 0,067

Les séquences de *T. saginata* sont très polymorphiques mais ne montrent pas de génotype spécifique de l'origine géographique de l'isolat. La date d'émergence de l'ancêtre commun à ces séquences a été estimée à environ 238 000 ans [100 000 – 426 000]. Les séquences sont trop proches génétiquement pour estimer d'autres dates de divergence. Nous avons travaillé uniquement sur 3 séquences de *T. asiatica* qui proviennent de 4 isolats différents. Les deux isolats de Taiwan ne présentent aucun polymorphisme. La date de divergence de ces séquences a été estimée à 41 000 ans [34 000 – 98 000]. Les 2 génotypes de *T. solium* semblent avoir émergé il y a 359 000 ans [165 000 - 619 000].

2. Le changement d'hôte définitif et l'émergence de *Taenia* chez l'homme

Une grande diversité de vers solitaires existe chez les canidés (10 espèces de *Taenia*) et les félidés (12 espèces de *Taenia*) ce qui suggèrent leur rôle ancien comme hôte définitif des ténias (Hoberg et al., 2001 ; Hoberg, 2006).

Les premiers carnivores félidés sont apparus il y a 35 Ma (Oligocène). Les félidés modernes ont évolué pendant une longue période du Miocène (10,2 à 6,2 Ma) (Johnson et al., 2006) ainsi que les canidés (12 à 0,3 Ma) (Bininda-Emonds et al., 1999).

Dix espèces de *Taenia* infectent deux lignées de la famille des canidés : *Vulpus* et *Canis*. Les premières traces fossiles de ces 2 lignées sont estimées entre 9 et 12 Ma pour *Vulpes* et entre 6 et 7 Ma pour *Canis* (Wayne et al., 1991).

De nombreuses espèces de *Taenia* parasitent des félidés du genre *Panthera* (*T. goyamai*, *T. ingwei*, *T. regis*, *T. simbae* et *T. acinonixy*), du genre *Lynx* (*T. rileyi*, *T. laticollis* et *T. macrocystis*) et du genre *Felis* (*T. selousi* et *T. taeniformis*). La diversification au sein de la lignée des chats domestiques et des lynx s'est produite pendant le Pliocène supérieur il y a environ 3 Ma (Johnson et al., 2006). Les espèces du genre *Panthera* ont émergé il y a environ 6 Ma. La séparation avec les jaguars (*Panthera onca*) se situe à la transition Pliocène-Pléistocène (Davis et al., 2010). La divergence entre les lions (*Panthera leo*) et les léopards (*Panthera pardus*) s'est produite quant à elle pendant le Pléistocène.

A la fin du Miocène, la famille de *Hyaenidae* se composait de 20 à 30 espèces. Cette famille a rapidement décliné et est actuellement la plus petite au sein des carnivores avec seulement 4 espèces : *Crocota*, *Hyaena*, *Parahyaena* et *Proteles* (Bininda-Emonds et al., 1999). Ces 4 espèces semblent avoir émergé en Afrique entre 15 et 7,3 Ma. *Proteles* est la seule espèce myrmécophage. Les 3 autres espèces sont des charognards, donc de potentiels hôtes définitifs pour l'ancêtre de *T. solium*. Ces 3 espèces auraient divergé il y a 8,6 Ma. *Hyaena* et *Parahyaena* forment un groupe qui a divergé de *Crocota* il y a 4,2 Ma (Koepfli et al., 2006).

Deux évènements indépendants de changements d'hôte ont conduit à la contamination du genre *Homo* par *Taenia*. L'ancêtre commun de *T. saginata* et *T. asiatica* contaminait les félidés alors que l'ancêtre de *T. solium* aurait colonisé les hommes à partir des hyénidés. Ces évènements se seraient produits à la transition Pliocène-Pléistocène (1,7 Ma) (Hoberg, 2006).

Des études récentes tendent à prouver que les hominidés sont devenus hôtes définitifs des ténias en Afrique sub-saharienne longtemps avant l'origine de l'homme moderne, de la domestication des porcs et des bœufs et avant le développement de l'agriculture (Hoberg et al., 2001). L'acquisition des *Taenia* par le genre *Homo* coïnciderait avec un changement de régime alimentaire d'herbivore à omnivore.

Le genre *Homo* a émergé entre 2,5 et 2,0 Ma. Des fossiles ont permis de déterminer l'origine d'*Homo erectus* il y a 2,0 Ma en Afrique équatoriale (Ciochon et Bettis, 2009). Au moins 12 genres de carnivores différents ont été identifiés en Afrique de l'Est et du Sud pendant le Pliocène et le Pléistocène, notamment les genres *Panthera*, *Hyena* et *Canis* (Lewis, 1997). Un hominidé nécessite une plus petite quantité de viande que de plante pour satisfaire ses besoins en protéine et en acide gras (Milton, 2003). Les premiers hommes auraient donc changé de régime alimentaire d'herbivore à omnivore. Ils seraient par conséquent entrés en compétition avec les hyénidés et félidés et se seraient contaminés en ingérant des proies contaminées par *Taenia*.

Ces changements d'habitudes alimentaires ont eu pour conséquence l'augmentation de la taille du cerveau et surtout une modification de la dentition (Milton, 2003). L'alternance de périodes glaciaires et interglaciaires entraîne des changements significatifs des conditions environnementales ce qui conduit à la diversification de certaines espèces (Lovette, 2005). Un lien a été établi entre la glaciation du milieu du Pliocène (3,0-2,4 Ma) et l'émergence et la dispersion du genre *Homo* (Larick et Ciochon, 1996). Pendant cette période de nombreux mammifères se sont éteints ou ont été poussés vers une spéciation ou dispersion. L'évolution des hominidés et leur dispersion sont plus particulièrement liées au refroidissement et à la sécheresse associés avec la glaciation de l'hémisphère Nord (deMenocal, 1995). Ces nouvelles tendances climatiques poussent les hominidés à s'adapter physiquement et à développer de nouveaux comportements.

Homo ergaster, également nommé *Homo erectus sensu lato* (Dennell et Roebroeks, 2005), a commencé ses migrations d'Afrique vers l'Asie entre 1,8 et 1,6 Ma (Larick et Ciochon, 1996). Des recherches sur le site de Dmanisi en République de Géorgie ont conduit à la découverte d'un crâne datant du début du Pléistocène (1,75 Ma). Ces fossiles montrent de grandes ressemblances avec ceux d'Afrique et pourraient représenter les premières migrations hors d'Afrique (Gabunia et al., 2000).

Les premières traces d'*Homo erectus* en Asie ont été mises en évidence à Java en Indonésie et dateraient d'environ 1,6 Ma (Swisher et al., 1994). L'occupation du Nord Est de l'Asie par le genre humain s'est produite ultérieurement il y a environ 1,3 Ma (Ciochon et Bettis, 2009). La dispersion d'*Homo erectus* a été favorisée par des changements significatifs de la faune à cette époque en Afrique, en Asie et en Europe (Anton et al., 2002). L'augmentation de taille d'*Homo erectus* ainsi que les changements de régimes alimentaires ont été des catalyseurs de la dispersion des premiers hommes (Anton et al., 2002). Les barrières naturelles topographiques ont eu une influence significative sur la dispersion en Asie et en Europe (Mithen et Reed, 2002). La latitude a également contraint sévèrement l'expansion des hommes (Dennell, 2003). Les environnements et climats tolérés par les hominidés ont augmenté avec le temps (Dennell, 2003). Afin de mieux appréhender le contexte géographique et climatique de cette époque, plusieurs modèles de dispersion ont été développés en intégrant les nombreuses données disponibles (Hughes et al., 2007 ; Nikitas et Nikita, 2005).

Récemment, une nouvelle espèce du genre *Homo* a été décrite, *Homo floresiensis*, retrouvé sur l'île de Flores en Indonésie (Brown et al., 2004). Cette découverte montre une plus grande diversité du genre *Homo*. Une analyse cladistique a été réalisée mais l'origine de cette espèce est encore incertaine. Elle aurait émergé avant ou après *Homo habilis* (Argue et al., 2009).

La date de divergence de *T. saginata* et *T. asiatica* a été estimée entre 0,78 et 1,71 Ma (Hoberg et al., 2001) ou 1,01 Ma [0,414–1,616] dans notre analyse. Cette période correspond aux migrations et à l'installation d'*Homo erectus* sur toute la surface de la Terre.

L'origine géographique de l'homme moderne, *Homo sapiens*, a longtemps été au cœur d'un débat. L'hypothèse d'une « évolution multirégionale » considère que l'homme a évolué de façon indépendante en Europe, en Asie et en Afrique à partir des populations locales. Cette hypothèse s'oppose au scénario « out of Africa » selon lequel l'homme moderne aurait évolué en Afrique entre 200 000 et 100 000 ans et aurait ensuite migré vers l'Eurasie (Walter et al., 2000). A l'heure actuelle, de nombreuses preuves fossiles ont montré la présence de l'homme moderne en Afrique il y a 150 000 ans (Klein, 2008). *Homo sapiens* aurait émergé en Afrique sub-saharienne entre 200 000 et 160 000 ans (McDougall et al., 2005 ; White et al., 2003). Il aurait ensuite migré en Eurasie où il aurait remplacé les autres populations du genre *Homo* (Larick et Ciochon, 1996).

Deux évènements majeurs de migration « out of Africa » se sont produits après la migration initiale d'*Homo erectus*. Pendant le Pléistocène moyen, une expansion culturelle (Acheuléen) a été mise en évidence par les recherches archéologiques (Klein, 2008). Cette période coïncide avec une augmentation de la capacité du crâne des premiers hommes (500 000 - 400 000 ans) (Templeton, 2002). La véritable expansion d'*Homo sapiens* vers l'Eurasie aurait commencé il y a seulement entre 38 000 et 68 000 ans (Endicott et al., 2009).

Certaines études tendent à montrer que les premiers hommes modernes étaient divisés en plusieurs populations qui ont suivi un modèle de migration complexe (Gunz et al., 2009). Des études ont montré l'existence d'un couloir ininterrompu d'eau douce à travers la région hyperaride du Sahara (Osborne et al., 2008) qu'*Homo sapiens* aurait emprunté pendant la période interglaciaire Eemien. Mais il se serait heurté à l'homme de Neanderthal qui occupait le territoire européen à cette époque (Oppenheimer, 2009). *Homo sapiens* aurait également emprunté les routes côtières pour quitter l'Afrique (Stringer, 2000).

Les divergences au sein de *T. solium* et de *T. saginata* se sont produites entre 359 000 [165 000 - 619 000] et 238 000 ans [100 000 - 426 000]. Cette période correspond à l'émergence d'*Homo sapiens* et surtout à la coexistence de 3 espèces du genre *Homo* : *Homo sapiens* en Afrique, *Homo neanderthalensis* en Europe et *Homo erectus* en Asie (Klein, 2009). La date d'émergence de *T. asiatica* a été estimée à 41 000 [34 000 - 98 000] et semble concomitante avec la migration et l'arrivée d'*Homo sapiens* en Eurasie.

3. L'homme moderne et le développement de l'agriculture

L'ancêtre sauvage (sanglier), *Sus scrofa*, du porc domestique, *Sus scrofa domesticus*, appartient à la famille des suidés. Cette espèce a une vaste aire de répartition qui recouvre l'ensemble de l'Eurasie, alors que d'autres espèces sont exclusivement asiatiques (Giuffra et al., 2000 ; Lion, 2006). L'origine du genre *Sus* a été établie dans la région de la péninsule malaise, Sumatra, Java, Bornéo et les Philippines. Au début du Pléistocène, *Sus scrofa* se distinguait de *Sus barbatus* (Lucchini, 2005). La domestication des porcs se serait produite indépendamment en Europe et en Asie il y a environ 9 000 ans (Giuffra et al., 2000). Cependant l'analyse d'os de suidés sur le site de Cyprus tend à montrer l'existence d'une période intermédiaire entre la chasse des espèces sauvages et l'élevage (Vigne et al., 2009). Dès la transition Pléistocène/Holocène, les relations entre les hommes et les porcs sauvages commençaient à changer.

L'analyse des variations de l'ADN mitochondrial des porcs a révélé une distance génétique importante entre les haplotypes européens et asiatiques, confirmant 2 processus indépendants de domestication (Alves et al., 2003). Deux centres de domestication ont été identifiés au Moyen-Orient (Near East) et en Asie (Far East) (Larson et al., 2005). La dispersion originale à partir des îles du Sud-Est asiatique vers l'Eurasie et la différenciation au sein de *Sus scrofa* se sont produites plusieurs millénaires avant que les porcs soient domestiqués par les hommes (Larson et al., 2007b). La répartition géographique des porcs sauvages et domestiques peut donner des indices concernant la domestication des porcs d'Asie (Wu et al., 2007).

Les foyers de domestication semblent multiples au sein de l'aire de distribution de *Sus scrofa*, notamment à partir de populations présentes en Asie (Chine, Inde...), en Océanie (Nouvelle-Guinée), au Proche-Orient et en Europe centrale (Lion, 2006). Des foyers de domestication ont également été identifiés dans la région du Mékong et dans la région de la rivière Yangtze (Wu et al., 2007).

Le processus de domestication des porcs en Europe a été différent de celui du Proche-Orient. La domestication en Europe est une conséquence de l'introduction de porcs domestiqués du Proche Orient et ne représente pas un événement indépendant. Le porc sauvage européen une fois domestiqué, est devenu la lignée prédominante au sein des porcs domestiques (Larson et al., 2007a).

La famille des bovidés (*Bovidae*) se subdivise en 2 sous-familles qui se sont développées sur des continents différents au début du Néogène : les antilopinés (*Antilopinae*) en Afrique et les bovinés (*Bovinae*) en Eurasie (Hassanin et Ropiquet, 2004). Les paléontologistes considèrent que les bovins (*Bovini*), tribu de la sous-famille des bovinés, seraient originaires d'Eurasie et seraient arrivés en Afrique à la fin du Miocène (5 - 7 Ma). La première divergence au sein des bovins (*Bovini*) se serait produite entre 5 et 8 Ma avec la scission en deux sous-tribus : *Bubalina* (buffle) et *Bovina* (bison et bœuf). Il y a environ 2 à 3 Ma, la sous-tribu *Bovina* était une espèce unique très répandue. La séparation de cette sous-tribu en 3 groupes majeurs se serait produite très rapidement : bœuf domestique, yak et bison, banteng et gaur (MacEachern et al., 2009). La phylogénie des bovins est variable et dépend des marqueurs utilisés ; l'ADN nucléaire ou mitochondrial ne donne pas la même topologie (Nijman, 2008).

Toutes les espèces actuelles de bovins descendent d'un même ancêtre commun, *Bos primigenius* (Burt, 2009) que l'on trouvait en Europe, en Asie et en Afrique du Nord (Bailey et al., 1996). L'estimation de date de divergence est encore incertaine et dépend de la méthode de calibration utilisée. Hiendleder *et al* ont estimé que les deux lignées *Bos taurus* et *Bos indicus* se sont séparées il y a environ 1,7 à 2,0 Ma (Hiendleder et al., 2008). Une méthode basée sur la datation de séquences anciennes au radiocarbone a permis d'estimer cette divergence à environ 147 000 ans (Ho et al., 2008). L'utilisation de la date de divergence entre *Bison* et *Bos* comme point de calibration a conduit à une estimation de 610 à 850 000 ans (MacHugh et al., 1997).

Plusieurs événements de domestication ont conduit à l'émergence de ces espèces bovines (Bradley et al., 1996 ; Loftus et al., 1994). La domestication a commencé depuis environ 11 000 ans (Beja-Pereira et al., 2006). La diversité allélique (microsatellites) des bœufs du Proche-Orient est significativement plus importante que celle des espèces d'Afrique, d'Europe ou encore d'Asie. Cette région représente un centre de domestication de *Bos taurus* (Loftus et al., 1999). L'analyse de l'ADN mitochondrial a également permis de corroborer cette hypothèse, avec un haplogroupe T identifié dans les séquences des bœufs domestiques d'Europe et du Proche Orient (Achilli et al., 2009 ; Edwards et al., 2007). En Europe, la diversité génétique des bovins suggère un scénario plus complexe avec des hybridations et croisements entre les bœufs domestiques et les ancêtres sauvages de ces régions (Gotherstrom et al., 2005).

La distribution des 2 lignées *B. taurus* et *B. indicus* en Chine semble liée à un environnement climatique et géographique particulier. *Bos taurus* est plus souvent retrouvé dans un environnement froid alors que *B. indicus* se trouve dans des zones plus chaudes (Lei et al., 2006).

Les ancêtres des *Bos* et *Sus* étaient donc présents en Afrique à l'époque du changement d'hôte de *Taenia*. La période néolithique a sûrement joué un rôle important dans l'évolution et la diversification du *Taenia* avec des modifications de régimes alimentaires et de comportements des populations humaines. Le développement des méthodes d'élevage ainsi que la domestication ont dû jouer un rôle dans l'acquisition de *Sus scrofa* et *Bos taurus* comme hôtes intermédiaires préférentiels de ces espèces de *Taenia*.

4. L'influence récente des hôtes sur l'évolution des *Taenia*

4.1 Situation de *Taenia saginata*

L'infection des bœufs par *T. saginata* persiste en Europe en dépit des mesures d'inspection vétérinaire au contraire de *T. solium* qui a été quasiment éradiqué des pays développés (Dorny et Praet, 2007). *Taenia saginata* pose très peu de problème chez l'homme. L'impact de la taeniasse étant réduit, le nombre d'étude l'est également.

La transmission entre l'animal et l'homme se poursuit et est principalement due aux habitudes alimentaires des hommes, à la nourriture consommée et aux modes de préparation (Pawlowski et Schultz, 1972). Différentes spécialités culinaires peuvent être source de contamination selon les pays : le « shalik » en Russie, en Estonie et en Ouzbékistan ; le « basterma » en Egypte, Turquie et au Moyen-Orient ; le « larb » au Laos et en Thaïlande. Le steak tartare et différents produits à base de bœuf cru sont très populaires dans certains pays européens (Pawlowski et Schultz, 1972). La difficulté de modifier les habitudes alimentaires d'une population réside principalement dans l'influence de l'environnement familial et de la société (Eertmans, 2001).

De nombreuses similarités existent entre *T. saginata* et *T. solium* cependant ils ne partagent pas le même profil génétique en fonction de l'origine géographique. La différence d'hôte intermédiaire peut être une explication à cette situation.

4.2 *Taenia asiatica* en Asie du Sud-Est

Le développement des techniques de biologie moléculaire a facilité le diagnostic et l'identification de *T. asiatica*. Sa morphologie similaire à celle de *T. saginata* ainsi que la ressemblance entre les œufs ont limité sa surveillance. Actuellement, *T. asiatica* a été identifié dans de nombreux pays d'Asie : la République de Corée, le Chine, Taiwan, l'Indonésie, la Thaïlande, le Japon, les Philippines et le Vietnam (Eom et al., 2009).

Dans les régions rurales de ces pays, les habitants ont pour habitude de manger les viscères du porc peu ou pas cuites (Fan et al., 1992). Ces habitudes alimentaires permettent la poursuite du cycle et la dissémination du parasite. Le tropisme des cysticerques de *T. asiatica* doit donc être responsable de cette répartition géographique restreinte. Ceci est un exemple de l'influence que peut avoir le comportement d'un hôte sur le parasite.

Des cysticerques de *T. asiatica* ont été retrouvés dans des porcs domestiques et dans des sangliers sauvages (Eom et Rim, 1992 ; Eom, 2006). Plusieurs espèces du genre *Sus* sont endémiques des îles du Sud-Est asiatique (Larson et al., 2007b ; Mona et al., 2007) (Figure 26).

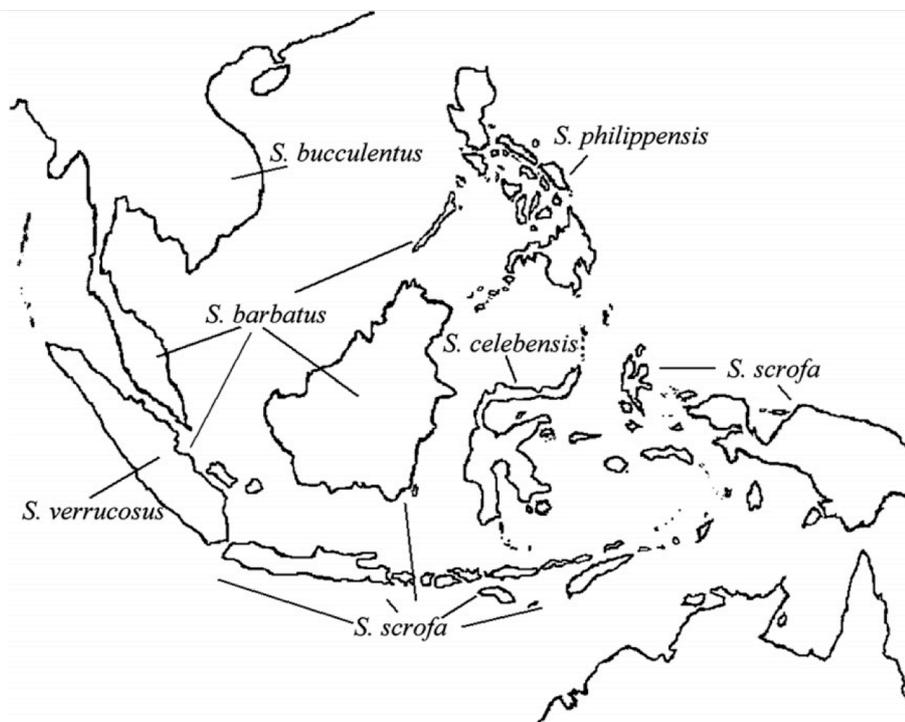


Figure 26: Distribution géographique en Asie du Sud-Est de différentes espèces de *Sus* (Mona et al., 2007)

Deux principaux clades ont divergé pendant le Pliocène en Asie du Sud-Est. Le premier inclut une population de sanglier sauvage des philippines (*Sus cebifrons*) et du Sulawesi (*Sus celebensis*). Le second est constitué par les porcs barbus indonésiens et malaysiens (*Sus barbatus*) et le porc sauvage d'Eurasie (*Sus scrofa*) (Lucchini, 2005). Les espèces *Sus* peuvent être classées plus précisément selon ces 3 groupes : (i) les animaux primitifs des îles Philippines (*Sus cebifrons*, *Sus philippensis*), Sulawesi et les îles alentours (*Sus celebensis*), (ii) les porcs sauvages d'Eurasie (*Sus scrofa* et *Sus salvanius*) et (iii) les autres porcs (*Sus barbatus* et *Sus verrucosus*) (Wu et al., 2006).

La diversité des hôtes intermédiaires potentiels dans cette région peut avoir influencé le changement d'hôte intermédiaire des bœufs aux porcs.

4.3 La biogéographie de *Taenia solium*

L'ancêtre de *T. solium* aurait colonisé l'homme comme hôte définitif lors de la transition Pliocène-Pléistocène il y a 1,8 Ma. Le changement d'hôte s'est donc opéré largement avant la domestication des porcs. Le changement de comportement des hommes et le développement de la chasse de proie sauvage ont sûrement contribué à l'établissement du parasite chez l'homme. La contamination par les fèces et le cannibalisme, causé par l'absence de ressources ou de viande fraîche, peuvent également avoir joué un rôle dans la dispersion du parasite (Baer, 1940). Deux génotypes de *T. solium* ont été décrits. Le premier regroupe les séquences de cysticerques collectés en Asie et l'autre les séquences d'Afrique et d'Amérique. La distribution géographique de *T. solium* a sûrement été influencée par l'un de ses hôtes.

L'ancêtre de *T. solium* a donc émergé en Afrique et est passé de la hyène à l'homme. Des études de paléoparasitologie ont prouvé la présence de *Taenia* partout dans le monde. Des œufs d'helminthes ont été retrouvés dans des coprolithes (entre 10 500 et 2 000 ans) du site archéologique de Cyprus mais également en Afrique (Egypte et Nubie), en Asie (Chine) et en Europe (Suisse, Autriche et France) (Goncalves et al., 2003).

Des œufs de Taenidés ont été identifiés en Amérique du Nord entre 6000 av J.C et 1300 ap J.C (Sianto et al., 2009). Du fait de l'absence de porcs et de bœufs pendant la préhistoire du Nouveau monde, les œufs retrouvés sont supposés provenir de *Taenia* du chien que l'homme aurait ingéré avec de la nourriture contaminée (Reinhard, 1990).

Les hommes préhistoriques se seraient contaminés fortuitement avec ces œufs du fait de la proximité avec les chiens. Il n'y a donc aucune preuve de la présence de *T. solium* ou *T. saginata* en Amérique avant la période coloniale.

Notre analyse des nouvelles séquences du Mexique a montré un polymorphisme entre les isolats. Les signatures nucléotidiques mettent en évidence au moins 3 sous-populations de *T. solium* qui se regroupent respectivement des séquences du Brésil et du Cameroun, de la séquence d'Équateur ou de la séquence de Tanzanie. Ces observations suggèrent de multiples arrivées de *T. solium* en Amérique du Sud.

Une analyse récente de la diversité génétique de *T. solium* a été réalisée au Mexique (Bobes et al., 2010). Elle a mis en évidence une faible variabilité entre les cysticerques d'un même porc. Nous avons également fait cette observation en étudiant les différentes localisations anatomiques des cysticerques chez le porc. Bobes a également identifié 2 sous-groupes distincts composés respectivement de 6 et 8 porcs provenant de différentes régions du Mexique, ce qui confirme des introductions multiples du parasite. Une analyse récente de l'ADN ribosomal (ITS1) de *T. solium* a identifié un groupe formé de séquences de Mexico et d'une séquence des Philippines (Hinojosa-Juarez et al., 2008). Ceci peut être expliqué par l'importation de porc pendant la colonisation des Philippines par les espagnols qui sont arrivés du Mexique en 1565 et par les commerces des porcs pendant l'Empire espagnol (1492-1898).

Des auteurs ont fait l'hypothèse que *T. solium* aurait été introduit en Amérique et en Afrique à partir de l'Europe pendant la période coloniale (Nakao et al., 2010). Nakao a émis l'hypothèse du rôle joué par la colonisation et la traite des esclaves pour expliquer l'introduction du parasite en Amérique du Sud (Nakao et al., 2002). Le flux des gènes de *T. solium* semble suivre les principales routes maritimes utilisées entre le XV^e et le XIX^e siècle (Martinez-Hernandez et al., 2009) ce qui semble corroborer cette hypothèse.

Des études phylogénétiques sur les virus ou d'autres parasites ont mis en évidence différents génotypes qui peuvent également refléter les migrations vers les Amériques. Les génotypes A et D du virus de l'hépatite B sont la signature de la colonisation Européenne et de la traite des esclaves d'Afrique vers le Brésil (Campos et al., 2005). Le virus de la fièvre jaune a émergé en Afrique de l'Est et a été importé en Amérique vraisemblablement d'Afrique de l'Ouest (Bryant et al., 2007).

L'introduction de *Plasmodium falciparum* en Amérique du Sud semble également être une conséquence de la colonisation et de la traite des esclaves (Hume et al., 2003). Des isolats de Colombie, du Brésil et de Bolivie sont proches mais ils forment des populations bien distinctes.

Des études sur la structure génétique des Afro-américains révèlent que leur ancêtre avait un profil proche des populations d'Afrique de l'Ouest non Bantu parlant le Niger Kordofanien (Bryc et al., 2010). Une autre étude a démontré que les Afro-américains avaient des origines Bantu et non Bantu, en accord avec les diasporas originaires d'Angola ou d'Afrique du Sud (Tishkoff et al., 2009). Les Afro-brésiliens de Sao Paulo ont des ancêtres du centre-ouest, de l'ouest et du sud-est de l'Afrique (Goncalves et al., 2008).

Tous ces arguments tendent à corroborer l'hypothèse du rôle de la période coloniale et de la traite des esclaves dans la dispersion des parasites et notamment de *T. solium*. En effet, les séquences ne montrent pas de polymorphisme particulier mettant en évidence une évolution ancienne. Par contre, il est impossible de déterminer si ce sont les Européens ou les esclaves africains qui ont transporté le parasite. Un plus grand nombre d'échantillons est nécessaire avec la plus grande variété de pays d'origine pour obtenir une phylogénie plus précise de *T. solium*.

Ces observations sont également confirmées par les résultats obtenus à Madagascar. Nous avons montré le rôle clé joué par les populations humaines dans l'introduction du parasite dans de nouveaux territoires.

III. Conclusion

L'étude des variations génétiques de *T. solium* et la construction de la phylogénie ont permis de mieux appréhender la biogéographie de ce parasite. Nous avons montré une plus grande diversité génétique de *T. solium* que précédemment décrite dans la littérature. Nous avons identifié différentes signatures nucléotidiques qui permettent la distinction des deux génotypes de *T. solium*. L'estimation des dates de divergence a apporté des éléments complémentaires qui nous ont permis d'établir un parallèle entre cette diversité et les migrations des populations humaines.

L'étude complémentaire réalisée sur les 3 taenias qui parasitent l'homme a permis d'augmenter le nombre de séquence analysée et par conséquent la robustesse des arbres dans l'analyse de datation. Ces nouvelles méthodes pour estimer les dates de divergence des organismes sont un progrès considérable pour établir l'histoire des espèces.

Nous avons pu mettre en évidence l'influence des hôtes sur l'évolution du parasite. Les évènements majeurs de diversification au sein du genre *Taenia* semblent donc lier aux changements d'hôtes intermédiaires ou définitifs. Le parasite au cours de son histoire a dû faire face à des changements d'environnement. L'adaptation dont il a la capacité, lui a permis de perdurer et d'élargir sa répartition.

L'influence de l'homme a une part importante dans l'évolution du parasite. Ainsi nous avons pu montrer l'influence qu'a pu jouer le régime alimentaire de l'homme dans le maintien du cycle de *T. saginata* ou de *T. asiatica*. Les migrations des populations humaines ont joué un rôle majeur dans sa répartition actuelle. Les premiers hommes (*Homo erectus* et *Homo sapiens*) ont joué un rôle considérable pour la dispersion du parasite hors d'Afrique. Le développement de l'agriculture a été une étape clé dans l'évolution humaine et a également permis aux 3 ténias d'établir des relations plus étroites avec leurs hôtes. Cet évènement a largement facilité la transmission du parasite entre ces hôtes. Les migrations humaines plus récentes, liées à la colonisation, ont provoqué l'arrivée de ces parasites en Amérique du Sud.

L'histoire des *Taenia* est donc étroitement liée à celle de leurs hôtes. Le développement des nouvelles techniques de datation a permis de mieux comprendre l'évolution de ce trio : parasite - hôte définitif – hôte intermédiaire.

Partie 2

Diagnostic de la
neurocysticercose

I. Introduction

Le diagnostic de la cysticerose humaine est basé sur un faisceau d'arguments. Plusieurs tests biologiques sont actuellement disponibles. Ils permettent de détecter les anticorps, les antigènes ou l'ADN présents dans les prélèvements (sérum, LCR) des patients. Le résultat de ces tests ne permet pas d'affirmer le diagnostic ; ces informations doivent être combinées aux données cliniques du patients ainsi qu'aux résultats des techniques d'imagerie (TDM ou IRM) si elles sont disponibles.

1. Diagnostic biologique de la cysticerose humaine

1.1 Immuno-diagnostic

La détection d'anticorps spécifiques en sérum, qui indique une infection présente ou passée, est utile pour réaliser des enquêtes épidémiologiques qui permettent une meilleure connaissance de la prévalence et de l'impact de la maladie (Willingham et Engels, 2006). La détection d'anticorps spécifiques dans le LCR et la détection d'antigènes dans le sérum ou le LCR sont principalement utilisées pour confirmer le diagnostic établi par l'imagerie.

a. Détection d'anticorps

La cysticerose provoque une réponse immunitaire de l'hôte, avec principalement des anticorps IgG (Carpio et al., 1998). Cependant, une élévation d'autres classes d'anticorps (IgA, IgE et IgM) a été observée (Odashima et al., 2002). La présence d'anticorps n'est pas un signe d'infection active (parasites viables) car les anticorps persistent longtemps après l'infection (Garcia et al., 1997). La détection d'anticorps peut conduire à un traitement inutile dans le cas où le parasite n'est pas viable (Garcia et Del Brutto, 2000). Deux tests de détection d'anticorps sont couramment utilisés : l'EITB (Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot) et l'ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (Figure 27).

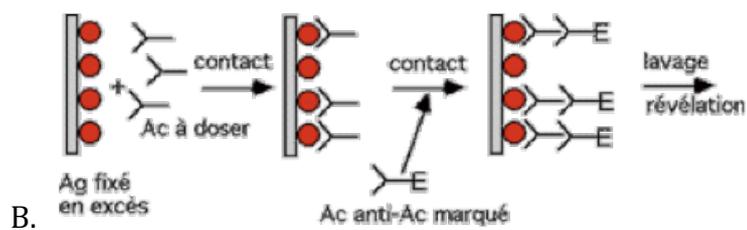
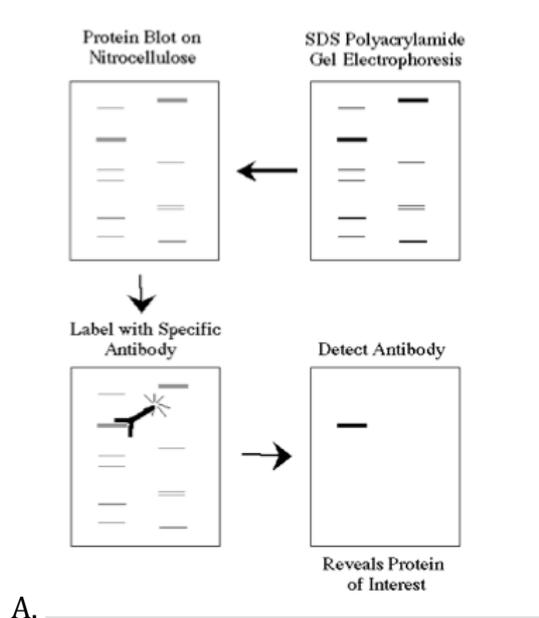


Figure 27 : Schéma des techniques EITB (A) et ELISA sandwich pour la détection d'anticorps (B) (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>)

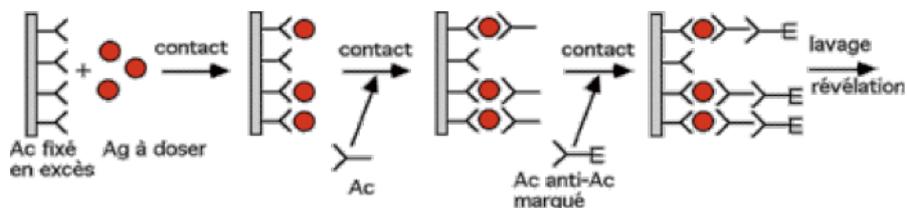


Figure 28: Schéma de la technique ELISA double sandwich pour la détection d'antigène (<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>)

L'EITB ou western blot pour la cysticerose, qui utilise 7 glycoprotéines purifiées par chromatographie d'affinité à la lentil lectine, extraites de cysticerques de *T. solium*, a été développé en 1989 (Tsang et al., 1989). Ce test a une spécificité de 100% et une sensibilité de 98%. Ce test a ensuite été modifié avec le développement d'antigène recombinant ou synthétique. TsRS1, qui appartient à la famille de protéines de 8kDa, a montré une sensibilité et une spécificité de 100% (Hancock et al., 2003). L'antigène recombinant GP50 utilisé dans un test EITB a montré une sensibilité de 90% et une spécificité de 100% (Hancock et al., 2004).

La technique ELISA est couramment utilisée dans les pays en développement du fait de sa rapidité et de sa simplicité (Dorny et al., 2003). Les antigènes utilisés dans ces tests sont produits de différentes manières. Ils peuvent être obtenus à partir d'un extrait total du cysticerque provenant de la viande de porc infectée (Corona et al., 1986). Le fluide vésiculaire des cysticerques de *T. saginata* (Harrison et al., 1989 ; Joshua et al., 1990) ou de *T. solium* (Larralde et al., 1986) est également utilisé pour produire des antigènes. Les métacestodes de *T. crassiceps* peuvent également servir à fournir ces antigènes (Barcelos et al., 2001 ; Espindola et al., 2005). La sensibilité de ces tests varie de 80 à 100%.

b. Détection d'antigène

Un des tests ELISA existant est basé sur la détection de l'antigène HP10 (Bobes et al., 2006 ; Fleury et al., 2007). Il peut être utilisé sur des prélèvements de sérums ou LCR. La spécificité de ce test est de 96,1 %. L'utilisation de ce test est préconisée pour des localisations dans l'espace sous-arachnoïdien de la base du cerveau ou dans les ventricules. Cet antigène a été décrit en 1989 pour le diagnostic de la cysticerose causée par *T. saginata* chez le bœuf (Harrison et al., 1989). Le test a ensuite été utilisé pour le diagnostic de la neurocysticerose humaine (Correa et al., 1989) car cet antigène a l'avantage d'être sécrété par le cysticerque vivant.

Les antigènes circulants du parasite sont détectés grâce à un test ELISA basé sur un anticorps monoclonal (Figure 28). Ce test détecte uniquement les cas de cysticerose active, donc la présence de cysticerques vivants. Un résultat positif est un fort indicateur d'une infection active, inflammatoire et avec de multiples cysticerques (Fleury et al., 2003).

Un autre test de détection d'antigène (B158/B60) a été développé. La sensibilité de ce test a été évaluée à 85% sur des patients ayant un unique kyste vivant et la spécificité a été déterminée à 92% (Dorny et al., 2003).

Ce test, moins cher et plus accessible que l'imagerie, peut permettre un meilleur suivi des patients. Le résultat du test ELISA devient négatif 3 mois après le début d'un traitement efficace.

1.2 Biologie moléculaire

Dans les pays en développement, le coût des techniques d'imagerie rend difficile l'accès à ce type d'outil diagnostique à la population. Les méthodes immunologiques de détection d'anticorps sont disponibles et simples de réalisation, cependant la persistance des anticorps peut entraîner des erreurs de traitement.

La présence d'ADN de *T. solium* a été mise en évidence dans le LCR de patients atteints de neurocysticercose (Almeida et al., 2006). La biologie moléculaire est donc une technique candidate pour confirmer le diagnostic chez des patients présentant une sérologie négative (Meri et al., 1999) et ne pouvant disposer d'un examen iconographique.

Plusieurs gènes, décrits dans la littérature, sont des candidats potentiels pour le développement d'un nouveau test diagnostique : COI (Theis et al., 1996), HDP2 (Gonzalez et al., 2002b ; Hernandez et al., 2008), ITS-1 & ITS-2 (Gonzalez et al., 2002a), ARN ribosomal 18S (Meri et al., 1999) et pTsol9 (Almeida et al., 2006).

Les techniques de biologie moléculaire décrites dans la littérature avaient pour but initial le diagnostic d'espèce. Une cysticercose, causée par *T. solium*, a ainsi été confirmée sur trois ours noirs (*Ursus americanus*) par l'amplification d'une portion de 282 pb du gène mitochondrial du cytochrome C oxydase I (COI) (Theis et al., 1996).

Les différences inter-espèces, entre *T. solium* et *T. saginata*, ont été étudiées sur le fragment d'ADN HDP2 ainsi que sur les séquences d'ADN ribosomal ITS-1 et ITS-2 (Internal transcribed spacer 1 and 2) (Gonzalez et al., 2002a).

La confirmation d'un diagnostic de neurocysticercose a également été établie grâce à la biologie moléculaire. Une PCR a été réalisée sur une biopsie, basée sur l'amplification d'un fragment du gène de l'ARN ribosomal 18S (Meri et al., 1999).

Pour la première fois en 2006, la biologie moléculaire a été utilisée comme outil diagnostique pour la cysticerose sur des échantillons de LCR. La PCR utilisée est basée sur l'amplification d'un motif répété du génome de *T. solium*, décrit en 1995 (Chapman et al., 1995). Cette technique, qui permet de détecter 10 fg d'ADN, a donc une sensibilité de 96,7% et une spécificité totale (Almeida et al., 2006).

Une autre technique a par la suite été développée, amplifiant un fragment de 171 pb de la séquence HDP2. Cette PCR semi-nested permet de détecter 0,174 fg d'ADN de *T. solium* avec une spécificité totale (Hernandez et al., 2008).

2. Problématique

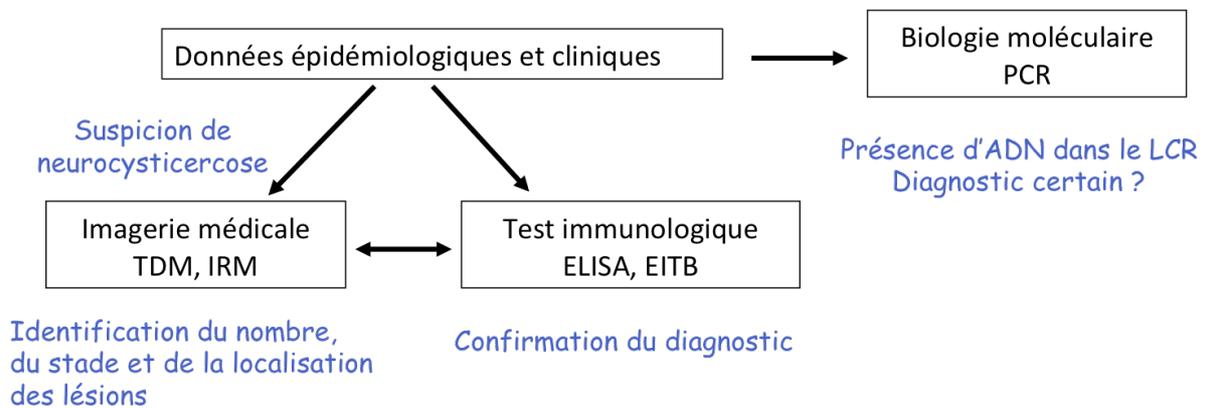


Figure 29 : Schéma des étapes du diagnostic de la neurocysticerose

Un résultat positif pour une PCR dans le LCR pourrait être intégré comme critère absolu ou majeur dans l'arbre décisionnel du diagnostic de la neurocysticerose (Figure 29). Ces nouvelles techniques doivent être validées et évaluées selon les différents stades et localisations des cysticerques dans le système nerveux central.

II. Matériels et méthodes

1. Population

Les tests diagnostiques ont été réalisés sur des échantillons de LCR de 121 patients mexicains (66 hommes et 55 femmes) qui ont été suivis à l'Institut National de Neurologie et de Neurochirurgie (INNN) de Mexico (Figure 30). Le recrutement des patients a été effectué entre 2004 et 2008. Comme contrôle, nous avons inclus 20 LCR de patients mexicains et 49 LCR de patients du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'hôpital Pitié-Salpêtrière.

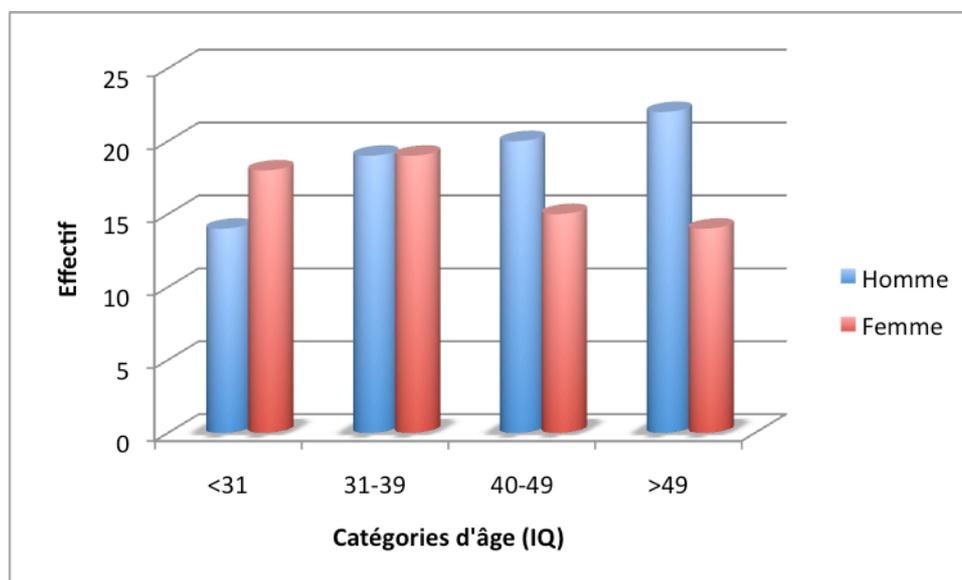


Figure 30 : Histogramme de la répartition de la population en fonction de l'âge et du sexe

Le diagnostic a été réalisé à partir des résultats obtenus à l'IRM et/ou TDM. Le stade (vésiculaire, colloïdal ou calcifié) ainsi que la localisation (parenchymal ou espace sous-arachnoïdien (ESA) et ventricule) ont été déterminés. La cellularité du LCR a été mesurée et considérée comme augmentée quand le nombre de cellules est supérieur à 5/ μ l.

2. Définitions des cas

Tous les patients ont été définis comme des cas de neurocysticercose en se basant sur les critères proposés par Del Brutto et al. (Del Brutto et al., 2001). La population a été divisée en plusieurs sous-catégories :

- patients avec une neurocysticercose confirmée avec des cysticerques vésiculaires (groupe 1), colloïdaux (groupe 2) ou calcifiés (groupe 3). Les patients avec des cysticerques vésiculaires ont été subdivisés en 2 catégories selon la localisation du parasite (parenchyme (groupe 1a) ou ESA/ventricule (groupe 1b))
- patients pour lesquels il subsiste un doute sur la présence de cysticerque vésiculaire (groupe 4). Ce groupe correspond principalement à des patients qui ont un élargissement de la base de la citerne mais sans preuve directe de la présence du parasite.
- patients inclus après un traitement efficace ne présentant plus de parasite à l'imagerie (groupe 5)

Les 20 contrôles sont des patients recrutés à l'INNN présentant d'autres troubles neurologiques. Dans le but de valider le protocole de l'EITB et la PCR, nous avons également travaillé sur 49 LCR de patients de la Pitié Salpêtrière. Tous ces prélèvements ont été testés avec le nouveau protocole de l'EITB et 25 d'entre eux ont servi à tester la spécificité de la PCR. Ces patients étaient diagnostiqués pour d'autres maladies parasitaires (toxoplasmose, paludisme, larva migrans viscérale) ou des troubles neurologiques.

3. Suivi des patients

Dix neuf patients ont été intégrés dans une étude complémentaire pour étudier l'évolution du résultat des tests au cours du suivi. Pour 14 patients, nous disposons de 2 prélèvements, pour 4 de 3 prélèvements et pour un patient de 4 prélèvements. Les contrôles n'ont pas été réalisés à intervalle régulier. Pour chaque prélèvement, nous disposons des données d'imagerie et les 4 tests biologiques ont été réalisés.

4. Matériel pour les techniques ELISA

Le matériel et les réactifs nécessaires à la réalisation des tests ELISA sont détaillés dans les tableaux 9 et 10.

Tableau 9 : Liste du matériel utilisé pour les tests ELISA

Matériel	Modèle	Fournisseurs
Plaque ELISA	plaque 96 puits fond plat Maxisorp Nunc	Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA
Laveur de plaque	Wellwash 4	Labsystem
Lecteur de plaque	Versa max microplate reader	Device Molecular, Sunnyvale, Californie, USA

Tableau 10 : Liste des réactifs utilisés pour les tests ELISA

Réactifs	Formule	Fournisseurs
Chlorure de sodium	NaCl	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Chlorure de potassium	KCl	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Phosphate de potassium monobasique	KH ₂ PO ₄	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Phosphate de sodium dibasique	Na ₂ HPO ₄	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Tween 20		Sigma-Aldrich, Toluca, Mexico
Sérum albumine bovine fraction V		Roche-Applied science, Mexico, Mexico
TMB solution prête à l'emploi		Zymed, San Francisco, Californie, USA
Acide sulfurique	H ₂ SO ₄	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Bicarbonate de sodium	Na ₂ CO ₃	J.T. Baker, Mexico, Mexico
Carbonate de sodium	NaHCO ₃	Merck, Mexico, Mexico
Anti-IgG humain couplé à HRP, ZyMax™		Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA
Conjugué streptavidine-HRP, ZyMax™		Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA
Anticorps HP10 biotinylé		Invitrogen, Carlsbad, Californie, USA

5. ELISA détection d'anticorps

La technique utilisée a précédemment été décrite (Larralde et al., 1986).

5.1 Préparation de l'antigène

- Obtention du fluide vésiculaire des cysticerques de *T. solium* : disséquer les cysticerques entiers sans rompre la vésicule et sans la capsule de tissu du porc qui l'entoure. Les déposer dans une boîte de pétri avec du PBS, les protéger de la lumière et les incuber dans la glace. Bien laver les cysticerques, absorber l'excès de PBS sur un papier filtre. Piquer le cysticerque avec une aiguille au dessus d'un tube à essai pour récupérer le fluide.
- Précipitation du calcium du fluide vésiculaire des cysticerques de *T. solium* : pour chaque millilitre de fluide vésiculaire ajouter 50 µl d'oxalate d'ammonium (0,3 M) et 10 µl d'ammoniac dilué au 1:10. Mélanger avec le vortex puis centrifuger 60 min à 20 000 rpm à 4°C. Collecter le surnageant, déterminer la concentration de protéines par la méthode de Lowry. Aliquoter et congeler à -20°C.

5.2 Préparation des tampons

- Tampon Carbonate 0,2 M pH 9,6 :

Na ₂ CO ₃	1,68 g dissout dans 100 ml d'eau distillée
NaHCO ₃	2,12 g dissout dans 100 ml d'eau distillée

Ajouter la solution de Na₂CO₃ lentement à la solution de NaHCO₃ et ajuster au pH 9,6.

- Tampon PBS (1X) :

NaCl	10,11 g
KCl	0,362 g
KH ₂ PO ₄	0,362 g
Na ₂ HPO ₄	1,449 g
Eau distillée	1 L
- Tampon de lavage PBS - Tween 0,3 % :

Tween 20	3 ml
PBS	1 L

- Tampon de blocage PBS - BSA 1 % - Tween 0,3 % :

Sérum albumine bovine	10 g
Tween 20	3 ml
PBS	1 L

- Solution d'arrêt de la réaction H₂SO₄ 0,2 M :

H ₂ SO ₄ concentré	1 ml
Eau distillée	49 ml

5.3 Protocole

- Sensibilisation avec une solution d'antigène de *T. solium* stock à 4,2 mg/ml de tampon carbonate à pH 9,6 (95,2 µl de cette solution à diluer dans 40 ml de tampon). Déposer 100 µl/puits pour obtenir une concentration finale de 1 µg/puits. Incuber une nuit à 4°C
- laver 4 fois avec du PBS - Tween 0,3 %
- Dépôts des échantillons dilués au 1/50 dans une solution de PBS-BSA 1% - Tween 0,3 % : déposer 100 µl/puits. Incuber 30 min à 37°C
- laver 4 fois avec PBS - Tween 0,3 %
- Dépôt du conjugué : préparer une solution anti-IgG humain - HRP diluée au 1/10000 dans une solution de PBS-BSA 1 %- Tween 0,3 % et déposer 100 µl/puits. Incuber 30 min à 37°C
- laver 4 fois avec PBS - Tween 0,3 %
- Dépôt du substrat : ajouter 100 µl/puits de substrat TMB. Incuber 15-20 min à 4°C
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl/puits de H₂SO₄ (0,2 M)
- Lire à 450 nm

5.4 Interprétation

Pour chaque plaque, cinq contrôles négatifs sont testés en duplicate. Le seuil de positivité est donc calculé pour chaque plaque. Ce seuil est égal à la moyenne des densités optiques (DO) des contrôles négatifs, plus deux écarts type et varie de 0,06 à 0,1.

6. ELISA détection d'antigène

L'antigène parasitaire HP10 a été détecté par une méthode ELISA précédemment décrite (Fleury et al., 2003).

6.1 Préparation des tampons

- Tampon de Borate pH 8,2
 - H₃BO₃ 6,18 g
 - Na₂B₄O₇ 9,54 g
 - Eau distillée 1 LAjuster le pH à 8,2 avec de l'acide chlorhydrique

- Tampon PBS (1X) :
 - NaCl 10,11 g
 - KCl 0,362 g
 - KH₂PO₄ 0,362 g
 - Na₂HPO₄ 1,449 g
 - Eau distillée 1 L

- Tampon de lavage NaCl 0,9 % - Tween 0,05 %:
 - NaCl 9,0 g
 - Tween 20 0,5 ml
 - Eau distillée 1 L

- Tampon de blocage PBS - BSA 1 % - Tween 0,05 % :
 - Sérum albumine bovine 10 g
 - Tween 20 0,5 ml
 - PBS 1 L

- Solution d'arrêt de la réaction H₂SO₄ 0,2 M :
 - H₂SO₄ concentré 1 ml
 - Eau distillée 49 ml

6.2 Protocole

- Sensibilisation avec une solution d'anticorps HP10 (10 µg/ml) dans le tampon borate pH 8,2. Déposer 100 µl/puits. Incuber 1 nuit à 4°C
- laver 4 fois avec une solution saline 0,9 % - Tween 0,05 %
- Bloquer la plaque avec une solution de PBS 1X – BSA 1% - Tween 0,05 %. Déposer 200 µl/puits. Incuber 1h à température ambiante
- laver 4 fois avec une solution saline 0,9 % - Tween 0,05 %
- Déposer 100 µl/puits de chaque échantillon non dilué. Chaque échantillon est réalisé en duplicate. Incuber 30 min à 37°C
- laver 4 fois avec une solution saline 0,9 % - Tween 0,05 %
- Dépôt du conjugué : préparer une solution d'anticorps anti-HP10 biotinylé (1/4000) dans du PBS 1X – BSA 1 % - Tween 0,05 %. Déposer 100 µl/puits. Incuber 30 min à 37°C
- laver 4 fois avec une solution saline 0,9 % - Tween 0,05 %
- Dépôt de la streptavidine : préparer une solution de streptavidine HRP (1/4000) dans du PBS 1X – BSA 1 % - Tween 0,05 %. Déposer 100 µl/puits. Incuber 30 min à 37°C
- laver 4 fois avec une solution saline 0,9 % - Tween 0,05 %
- Dépôt du substrat : ajouter 100 µl/puits de substrat TMB. Incuber 30 min à 4°C
- Arrêter la réaction en ajoutant 100 µl/puits de H₂SO₄ (0,2 M) (Figure 31)
- Lire à 450 nm

6.3 Interprétation

Pour chaque plaque, cinq contrôles négatifs sont testés en duplicate. Le seuil de positivité est donc calculé pour chaque plaque. Ce seuil est égal à la moyenne des DO des contrôles négatifs, plus deux écarts type et varie de 0,12 à 0,19.

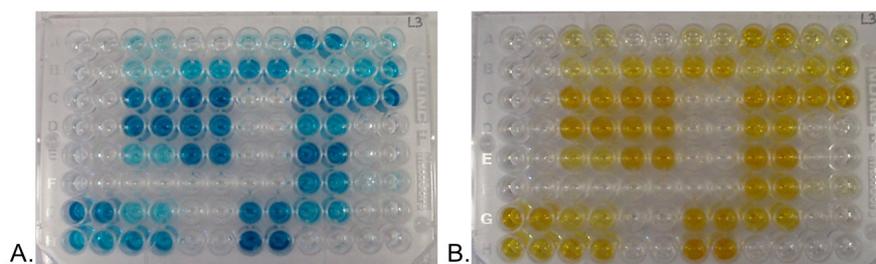


Figure 31 : Plaques ELISA avant (A) et après (B) l'ajout de la solution d'arrêt

7. EITB ou Western Blot

Un kit commercial Cysticercosis Western Blot IgG (CYS-WB96G, LDBIO Diagnostics, Lyon, France) est utilisé comme test qualitatif de diagnostic sérologique par immunoblot de la cysticercose.

7.1 Protocole

- Distribuer 1,2 ml de tampon (R2) dans chaque puits, distribuer les bandelettes puis distribuer 50 µl de LCR et 25 µl de contrôle positif. Incuber sur un agitateur oscillant pendant 90 min à température ambiante
- Laver 3 fois avec le tampon de lavage
- Distribuer 1,2 ml de conjugué anti-IgG (R4) dans chacun des puits. Incuber sur un agitateur oscillant pendant 60 min à température ambiante
- Laver 3 fois avec le tampon de lavage
- Distribuer 1,2 ml de substrat NBT/BCIP (R6) dans chacun des puits. Incuber sur un agitateur oscillant à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le développement de la coloration dure en général entre 10 et 30 min
- Déposer les bandelettes sur du papier absorbant type Whatman et laisser sécher
- Estimer le poids moléculaire des bandes antigéniques révélées

Le test a été réalisé deux fois avec une modification du protocole conseillée par le fabricant. Dans ce nouveau protocole, la première incubation est prolongée toute une nuit (soit 16 h environ) et la dernière incubation dure 1 h. Ces modifications permettent d'augmenter la sensibilité du test tout en conservant la spécificité (Figure 32). Les bandes apparaissent plus nettes.

7.2 Interprétation

La présence d'au moins 2 bandes parmi P6-8, P12, P23-26, P39, P45 et P50-55 est indicative d'une neurocysticercose (Figure 33).

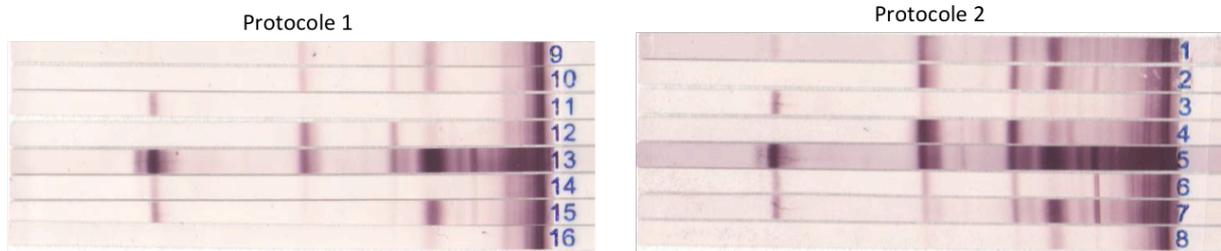


Figure 32 : Comparaison des 2 protocoles de l'EITB. Le protocole normal (1) a été utilisé pour les bandelettes 9 à 16. Les mêmes prélèvements ont été testés avec le nouveau protocole (2) (bandelettes 1 à 8).

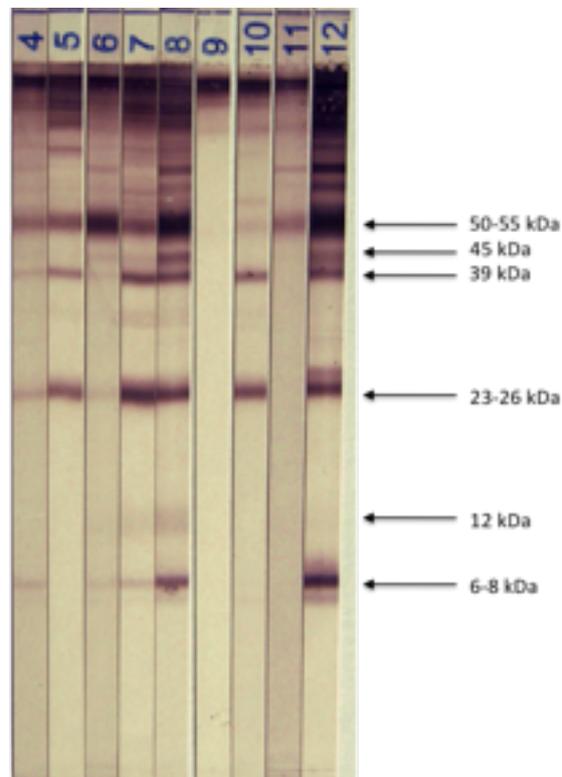


Figure 33: Photo de bandelettes de Western Blot (EITB) avec le poids moléculaire de différentes bandes (en kDa) obtenues avec le nouveau protocole. Les bandelettes 4 à 8 et 10 sont positives. Les bandelettes 9 et 11 sont négatives. La bandelette 12 représente le contrôle positif du kit CYS-WB96G (LDBIO Diagnostics, Lyon, France).

8. PCR

Au préalable, les échantillons de LCR sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 10 min. Le culot est repris dans 100 µl de PBS. Une extraction d'ADN est ensuite réalisée avec DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Le gène cible de cette technique est un élément répétitif, pTsol9, du génome de *T. solium* (GenBank accession code : U45987) (Almeida et al., 2006 ; Chapman et al., 1995). Le fragment amplifié a une longueur de 120 pb et peut être répété deux ou trois fois (bandes de 278 pb et 436 pb respectivement) (Figure 34). Les amorces utilisées (Operon, Ebersberg, Allemagne) sont : TSF 5'-CAGGGTGTGACGTCATGG-3' (amorce sens) et TSR 5'-AGGAGGCCAGTTGCCTAGC-3' (amorce anti-sens) (Almeida et al., 2006).

La réaction de polymérisation est réalisée dans un volume final de 50 µl contenant du MgCl₂ à 1,5 mM, 200 µM de chaque dNTP (Q-BIOgene, Europe), 0,5 µM de chaque amorce, 1,25 U de Taq polymérase (AmpliTaq Gold® DNA polymérase, Applied Biosystems, Foster city, Californie, USA) et 2 µl d'ADN extrait. L'ADN est préalablement dénaturé à 95°C pendant 5 min. Puis la réaction comprend 38 cycles avec une dénaturation à 95°C pendant 45 s, une hybridation à 56°C pendant 1 min puis une élongation à 72°C pendant 45 s. Une élongation finale est effectuée pendant 10 min à 72°C.

Pour chaque prélèvement, 2 tubes sont préparés : le premier avec 2 µl d'ADN extrait à partir du LCR et le second avec seulement 1 µl d'ADN de l'échantillon mélangé à 1 µl d'ADN contrôle extrait de cysticerques de porcs. L'amplification dans le second tube prouve qu'il n'y a pas d'inhibiteur. La détection des produits d'amplification est réalisée sur gel d'agarose à 2% : 10µl du volume réactionnel sont déposés avec 2 µl de tampon de charge 6X. La taille du fragment amplifié est évaluée grâce à un marqueur de poids moléculaire (100 bp DNA Ladder, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les fragments d'ADN sont révélés grâce au SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen).

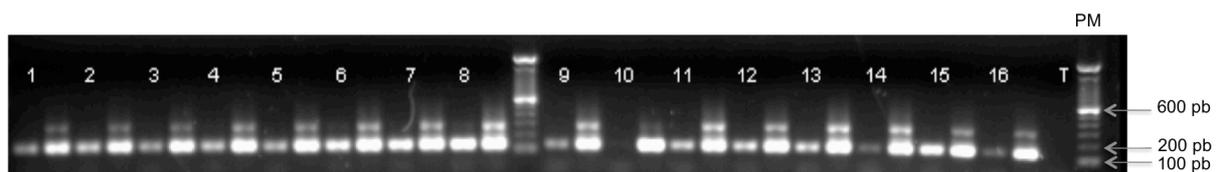


Figure 34 : Photo d'un gel d'agarose après amplification du fragment pTsol9. Les puits contrôles montrent les fragments répétés. Les puits 1 à 16 représentent des échantillons de patients avec leur contrôle. Le puits T contient le témoin de contamination de la PCR. Le marqueur de poids moléculaires est au milieu et à droite.

9. Analyse statistique

Les données ont été traitées avec les logiciels Microsoft® Excel® 2008 pour Mac (v 12.2.4) et Stata/SE 9.0 pour Mac. La sensibilité et la spécificité de chaque technique ont été calculées avec l'intervalle de confiance à 95%. Les valeurs obtenues ont été comparées en utilisant le test du χ^2 de Pearson avec la correction de Yates si nécessaire.

La concordance entre chaque test a été estimée avec le coefficient kappa de Cohen avec l'intervalle de confiance à 95%. Si $K = 1$, la concordance est parfaite. Entre 0,81 et 1, la concordance est excellente ; bonne entre 0,61 et 0,8 ; modérée entre 0,41 et 0,6 ; faible entre 0,21 et 0,4 ; nulle entre 0 et 0,2.

La corrélation entre le nombre de cellules et les valeurs de DO des 2 tests ELISA a été calculée. Le test non paramétrique de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer le nombre de cellules en fonction des résultats de l'EITB et de la PCR.

10. Considérations éthiques

Cette étude répond à la réglementation de la recherche avec des sujets humains considérés par les lois mexicaines et les règlements internationaux. Elle est également conforme à tous les aspects éthiques examinés dans le Règlement général de la Santé de recherches cliniques. Tous les participants sont portés volontaires pour participer à l'étude, ont fait don d'un échantillon et ont donné leur consentement éclairé. Les résultats sont confidentiels. Un neurologue à l'INNN a été consulté pour les patients qui ont été diagnostiqués avec une neurocysticercose et nécessitaient une attention médicale et un traitement spécifique. Les patients atteints d'autres affections neurologiques ont reçu des conseils et une aide médicale à l'INNN.

III. Résultats

1. Description de la population

Le Tableau 11 et 12 et les Figures 35 à 37 résument les principales caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus dans cette étude et de leur prélèvement de LCR. Sur les 141 patients, 121 ont une neurocysticercose confirmée et 20 sont des contrôles. Les 121 cas de neurocysticercose se répartissent en 5 groupes :

- groupe 1 (n = 51) : stade vésiculaire [groupe 1a (n = 7) : stade vésiculaire dans le parenchyme ; groupe 1b (n = 44) : stade vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules] ;
- groupe 2 (n = 6) : stade colloïdal ;
- groupe 3 (n = 31) : stade calcifié ;
- groupe 4 (n = 19) : patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ;
- groupe 5 (n = 14) : patients inclus après traitement.

La cellularité des LCR a été enregistrée pour 117 cas de neurocysticercose et 11 contrôles. Pour les cas de neurocysticercose, la cellularité varie de 0 à 399 cellules/ μ l (moyenne = $30,6 \pm 56,4$, médiane = 9) et est inflammatoire pour 69 des prélèvements (59%) tandis que pour les contrôles, elle varie de 0 à 80 (moyenne = $10,9 \pm 26,0$, médiane = 2) et est inflammatoire pour seulement 2 échantillons (22,2%). Cette donnée est manquante pour 2 échantillons vésiculaires, 1 calcifié ainsi que pour le prélèvement d'un patient inclus après traitement. La cellularité pour chaque catégorie est décrite dans le Tableau 11.

Nous avons exclu 5 patients de cette analyse car l'imagerie ne permettait pas d'établir un diagnostic certain. Il s'agissait de 2 hommes et 3 femmes. L'âge médian de ces 5 patients était de 29 ans [20 - 46] et le nombre de cellules médian était de 6 [1 - 12].

Tableau 11: Caractérisation des échantillons de LCR des patients atteints de neurocysticercose et des contrôles.

	N	Homme/Femme	Age (médiane)	Nb of cellule/μl (médiane)	Hydrocéphalie
NC confirmée	121	66/55	41 [19 - 72]	9 [0 - 399]	44
<i>Groupe 1</i>	51	27/24	40 [19 - 72]	19 [0 - 399]	26
<i>Groupe 1a</i>	7	4/3	38 [22 - 56]	4 [0 - 53]	0
<i>Groupe 1b</i>	44	23/21	42 [19 - 72]	25,5 [0 - 399]	26
<i>Groupe 2</i>	6	3/3	44,5 [28 - 51]	6,5 [0 - 12]	0
<i>Groupe 3</i>	31	11/20	39 [21 - 67]	3 [0 - 85]	5
<i>Groupe 4</i>	19	14/5	46 [28 - 69]	24 [0 - 180]	9
<i>Groupe 5</i>	14	11/3	41 [23 - 59]	4 [0 - 176]	4
Contrôle (Mexico)	20	9/11	28 [15 - 59]	2 [0 - 80]	–
Contrôle (Paris)	49	32/17	49 [1 - 74]	–	–

Non inflammatoire \leq 5 cellules mononucléées dans le LCR/ μ l, Inflammatoire $>$ 5 cellules mononucléées dans le LCR/ μ l. NC = neurocysticercose ; Groupe 1 = vésiculaire (1a = vésiculaire dans le parenchyme, 1b = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement.

Tableau 12: Résultats de l'ELISA-Ac, l'ELISA-Ag, du western-blot (ou EITB) et de la PCR en fonction des différents groupes, en nombre de patients positifs ou négatifs par groupe.

	N	ELISA-Ac		ELISA-Ag		EITB		PCR	
		POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG	POS	NEG
NC confirmée	121	109	12	65	56	98	23	116	5
<i>Groupe 1</i>	51	49	2	41	10	46	5	50	1
<i>Groupe 1a</i>	7	6	1	3	4	4	3	7	0
<i>Groupe 1b</i>	44	43	1	38	6	42	2	43	1
<i>Groupe 2</i>	6	6	0	2	4	5	1	6	0
<i>Groupe 3</i>	31	23	8	7	24	19	12	28	3
<i>Groupe 4</i>	19	18	1	12	7	18	1	18	1
<i>Groupe 5</i>	14	13	1	3	11	10	4	14	0
Contrôle (Mexico)	20	2	18	0	20	0	20	4	16
Contrôle (Paris)	49	NF	NF	NF	NF	0	49	0	25

POS=positif, NEG=négatif ; NF = non fait ; NC = neurocysticercose ; groupe 1 = vésiculaire (1a = vésiculaire dans le parenchyme, 1b = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement.

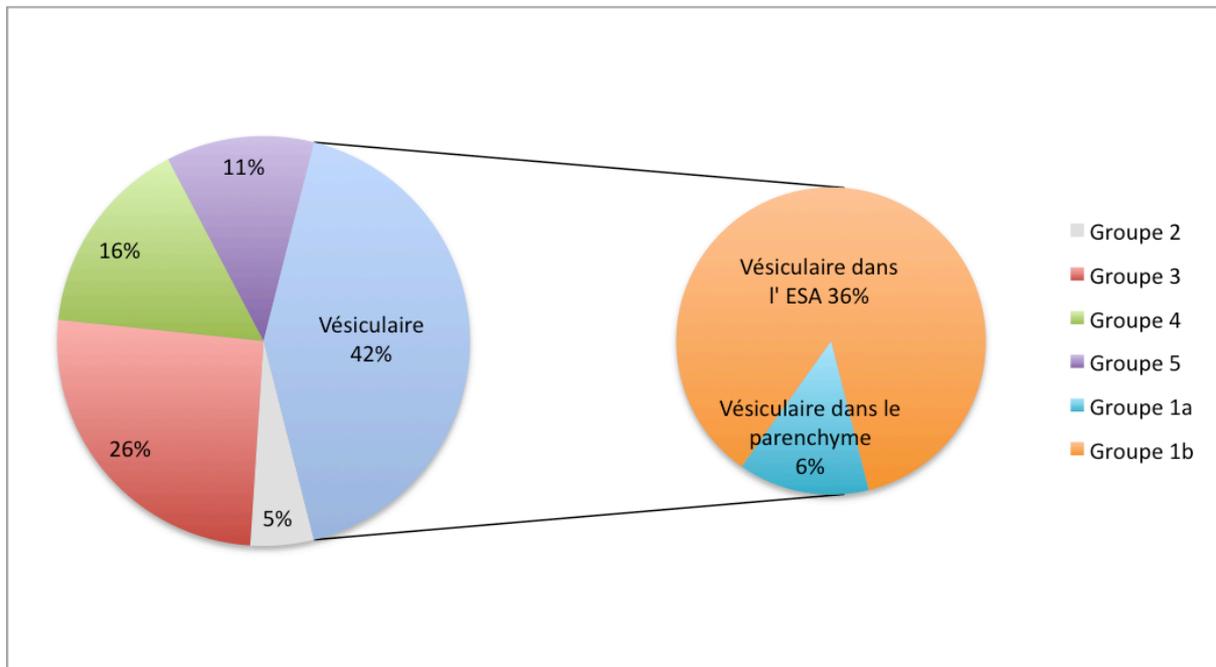


Figure 35 : Diagramme par secteur de la répartition des cas de neurocysticercose en fonction du groupe.

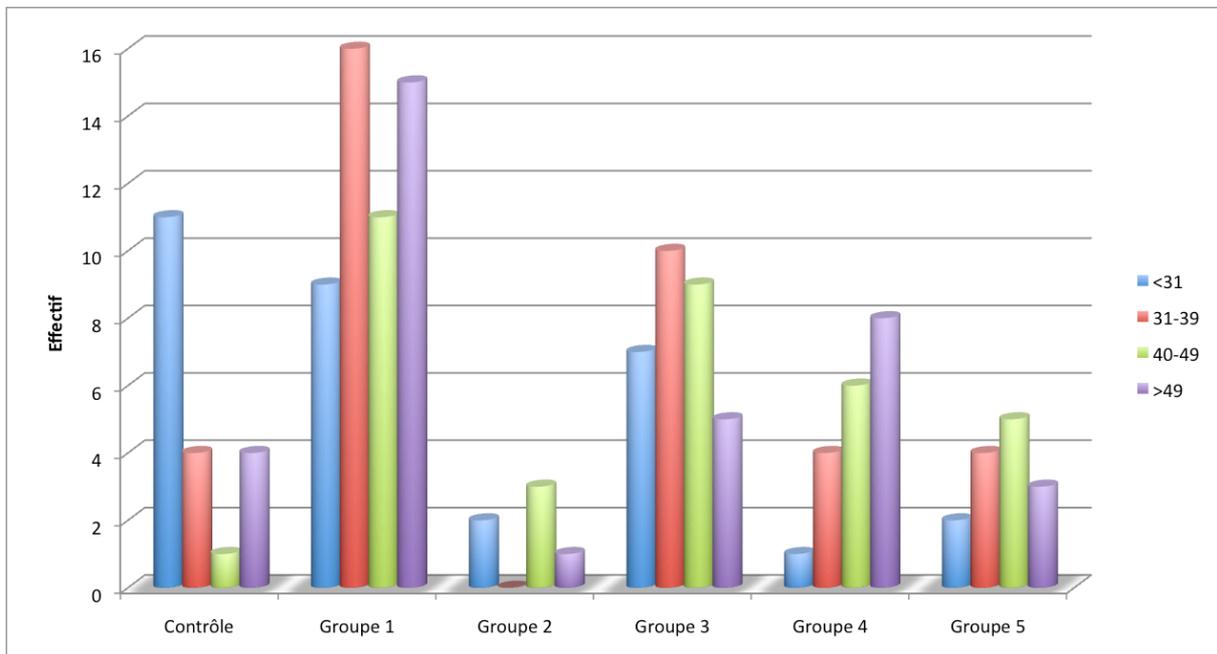


Figure 36 : Histogramme de la répartition de la population en fonction du groupe et des différentes catégories d'âge (IQ).

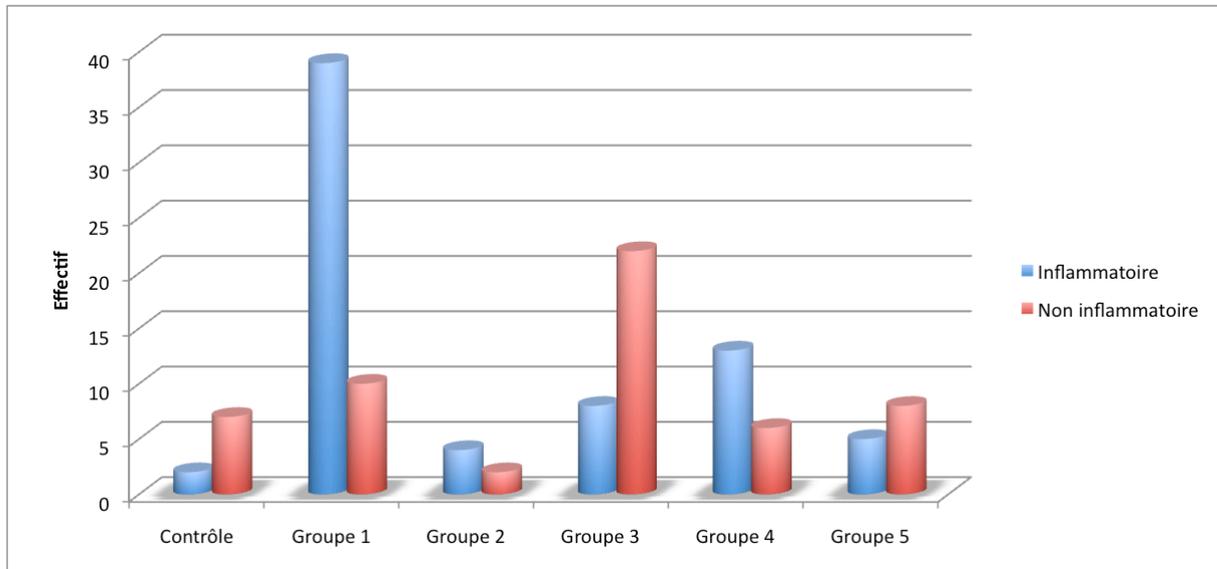


Figure 37 : Histogramme de la répartition de la population en fonction du groupe et de l'inflammation du LCR

2. Sensibilité et spécificité

Le Tableau 13 montre les valeurs de sensibilité de chaque technique utilisée. L'ELISA-Ac et l'EITB ont une sensibilité qui varie de 57,1 à 100 % en fonction de la localisation et du stade du parasite. L'ELISA-Ac a une meilleure sensibilité pour les cysticerques colloïdaux alors que l'EITB atteint une sensibilité de 95,5 % pour la détection des cysticerques vésiculaires dans l'espace sous-arachnoïdien ou dans les ventricules.

La sensibilité du test de détection de l'antigène HP10 varie de 21,5 % jusqu'à 88,9 % pour une neurocysticercose active dans l'espace sous-arachnoïdien ou dans les ventricules.

Pour le diagnostic des parasites vésiculaires en général, la sensibilité de l'ELISA-Ag est significativement plus faible que celle de l'ELISA-Ac et de la PCR. Cette différence disparaît quand les échantillons sont analysés selon la localisation du parasite du fait de la petite taille de l'échantillon du groupe 1a. La sensibilité des l'ELISA-Ag pour le diagnostic dans les groupes 2, 3 et 5 est également plus faible que celle des autres techniques. Cette différence est significative quand ce test est comparé à l'ELISA-Ac, à l'EITB et à la PCR dans le cas des groupes 3, 4 et 5.

Comparée aux résultats des autres tests, la sensibilité de la PCR est la plus élevée quel que soit le groupe. Cette différence est significative entre la PCR et l'EITB dans la population générale et dans les cas de cysticerques calcifiés.

La sensibilité de la détection d'anticorps avec la technique ELISA est plus élevée dans tous les groupes que celle obtenue avec l'EITB mais cette différence n'est pas significative ($p > 0,05$).

La spécificité de chaque technique varie de 80 % pour la PCR à 100 % pour l'ELISA-Ag et l'EITB sans différence significative entre ces valeurs. Sur les 20 contrôles, 4 sont positifs avec la PCR. Un échantillon contrôle est positif avec l'ELISA-Ac et la PCR. Ce patient était atteint de cavernomes multiples. La PCR était positive pour un même patient qui présentait un kyste cérébral à l'imagerie. Le dernier prélèvement positif avec la PCR provenait d'un patient avec une hydrocéphalie chronique mais sans autre signe clinique en faveur d'une neurocysticercose. La spécificité de la PCR et de l'EITB a été mesurée sur des prélèvements français et dans ce cas, elle atteint 100 % pour l'EITB et pour la PCR.

Tableau 13: Sensibilité et spécificité de chaque technique en fonction des différents groupes et de la localisation avec l'intervalle de confiance à 95%.

	Sensibilité						P					
	N	ELISA-Ac	ELISA-Ag	EITB	PCR		P1	P2	P3	P4	P5	P6
NC confirmée	121	90,1 [83,3-94,8]	53,7 [44,4-62,8]	81 [72,9-87,6]	95,9 [90,6-98,6]		<0,0001	0,07	0,13	<0,0001	<0,0001	0,0006
<i>Groupe 1</i>	51	96,1 [86,5-99,5]	80,4 [66,9-90,2]	90,2 [78,6-96,7]	98 [89,6-100]		0,03	0,43	1	0,26	0,01	0,21
<i>Groupe 1a</i>	7	85,7 [42,1-99,6]	42,9 [9,9-81,6]	57,1 [18,4-90,1]	100 [59-100]		0,27	0,56	1	1	0,07	0,19
<i>Groupe 1b</i>	44	97,7 [88-99,9]	86,4 [72,6-94,8]	95,5 [84,5-99,4]	97,7 [88-99,9]		0,12	1	0,47	0,27	0,12	1
<i>Groupe 2</i>	6	100 [54,1-100]	33,3 [4,33-77,7]	83,3 [35,9-99,6]	100 [54,1-100]		0,06	1	1	0,24	0,06	1
<i>Groupe 3</i>	31	74,2 [55,4-88,1]	22,6 [9,59-41,1]	61,3 [42,2-78,2]	90,3 [74,2-98]		<0,0001	0,42	0,18	0,005	<0,0001	0,02
<i>Groupe 4</i>	19	94,7 [74-99,9]	63,2 [38,4-83,7]	94,7 [74-99,9]	94,7 [74-99,9]		0,04	1	1	0,04	0,04	1
<i>Groupe 5</i>	14	92,9 [66,1-99,8]	21,4 [4,66-50,8]	71,4 [41,9-91,6]	100 [76,8-100]		<0,0001	0,33	1	0,02	<0,0001	0,09
Spécificité												
Contrôle (Mexico)	20	90 [68,3-98,8]	100 [83,2-100]	100 [83,2-100]	80 [56,3-94,3]		0,53	0,46	0,66	1	0,11	0,11
Contrôle (Paris)	49			100 [97,2 -100]	100 [86,3-100]							1

P1: ELISA-Ac vs ELISA-Ag, P2: ELISA-Ac vs EITB, P3: ELISA-Ac vs PCR, P4: ELISA-Ag vs EITB, P5: ELISA-Ag vs PCR, P6: EITB vs PCR. Il y a une différence significative quand $p < 0,05$ (*)

NC = neurocysticercose ; groupe 1 = vésiculaire dans le parenchyme, 1a = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement.

Nous avons observé la fréquence de présence de chaque bande du western blot en fonction des différents groupes (Tableau 14). Les bandes de 23-26 kDa et 39 kDa sont présentes dans 99 et 98% des EITB. On ne remarque pas de variations de fréquence de ces bandes selon les groupes. Les bandes de 12 et 45 kDa sont présentes dans 38% et 57% des EITB positifs. On peut noter une différence entre les groupes pour la bande de 45 kDa. Elle semble plus souvent présente dans les groupes 1 et 4 avec 67 et 72%. Elle pourrait donc être un indicateur d'un stade vésiculaire. En effet, sa fréquence est moins élevée dans les groupes 2 et 3 qui correspondent au stade colloïdal et calcifié. Cependant, ces différences ne sont pas significatives car les effectifs sont insuffisants.

Tableau 14 : Fréquence (en pourcentage) de présence des différentes bandes (en kDa) dans les EITB positifs pour les différents groupes

	N (WB+)	Bandes de Western blot					
		6-8	12	23-26	39	45	50-55
NC confirmée	121 (98)	89	38	99	98	57	96
<i>Groupe 1</i>	51 (46)	96	50	100	100	67	98
<i>Groupe 1a</i>	7 (4)	100	50	100	100	50	75
<i>Groupe 1b</i>	44 (42)	95	50	100	100	69	100
<i>Groupe 2</i>	6 (5)	80	40	80	100	20	100
<i>Groupe 3</i>	31 (19)	79	26	100	95	32	89
<i>Groupe 4</i>	19 (18)	89	33	100	100	72	94
<i>Groupe 5</i>	14 (10)	80	10	100	90	50	100

NC = neurocysticercose ; groupe 1 = vésiculaire (1a = vésiculaire dans le parenchyme, 1b = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement.

3. Concordance

Nous avons également évalué la concordance entre chaque test dans les différentes sous populations (Tableau 15). Les valeurs du Kappa varient de 0,11 à 0,89. Les meilleures valeurs de kappa sont observées entre le test ELISA-Ac et l'EITB. Entre ces 2 tests, la concordance est excellente dans les groupes 1, 1b et 4, bonne dans les groupes 2, 3 et 5 et modérée uniquement dans le cas de cysticerques vésiculaires dans le parenchyme (groupe 1a). La plus faible concordance est observée entre la PCR et le test ELISA-Ag, étant faible ou nulle dans 4 des 7 catégories de patients. L'ELISA-Ag a une faible concordance avec tous les autres tests dans les groupes 3 et 5. Dans ce cas, une valeur de concordance est modérée et les 5 autres sont faibles ou nulles.

Tableau 15 : Concordance estimée par le coefficient kappa de Cohen avec l'intervalle de confiance à 95% entre chaque test.

	ELISA-Ac vs ELISA-Ag	ELISA-Ac vs EITB	ELISA-Ac vs PCR	ELISA-Ag vs EITB	ELISA-Ag vs PCR	EITB vs PCR
NC confirmée	0,38 ^d (0,26-0,49)	0,76 ^b (0,64-0,88)	0,50 ^c (0,32-0,68)	0,49 ^c (0,36-0,62)	0,21 ^d (0,10-0,31)	0,41 ^c (0,25-0,58)
Groupe 1	0,70 ^b (0,53-0,86)	0,84 ^a (0,70-0,97)	0,75 ^b (0,57-0,92)	0,79 ^b (0,65-0,94)	0,54 ^c (0,36-0,73)	0,67 ^b (0,48-0,85)
Groupe 1a	0,46 ^c (0,10-0,82)	0,58 ^c (0,24-0,93)	0,60 ^c (0,29-0,91)	0,51 ^c (0,0-0,99)	0,31 ^d (0,02-0,60)	0,40 ^d (0,1-0,71)
Groupe 1b	0,76 ^b (0,60-0,92)	0,89 ^a (0,77-1)	0,77 ^b (0,59-0,94)	0,87 ^a (0,74-0,99)	0,62 ^b (0,43-0,82)	0,74 ^b (0,57-0,92)
Groupe 2	0,31 ^d (0-0,67)	0,69 ^b (0,39-1)	0,66 ^b (0,36-0,96)	0,19 ^e (0-0,65)	0,23 ^d (0-0,52)	0,55 ^c (0,24-0,87)
Groupe 3	0,28 ^d (0,10-0,47)	0,76 ^b (0,59-0,94)	0,42 ^d (0,18-0,65)	0,42 ^c (0,19-0,66)	0,11 ^e (0-0,25)	0,37 ^d (0,16-0,59)
Groupe 4	0,59 ^c (0,36-0,82)	0,89 ^a (0,76-1)	0,69 ^b (0,47-0,92)	0,68 ^b (0,46-0,90)	0,51 ^c (0,28-0,74)	0,69 ^b (0,48-0,91)
Groupe 5	0,22 ^d (0-0,44)	0,69 ^b (0,45-0,93)	0,71 ^b (0,48-0,94)	0,38 ^d (0,06-0,69)	0,16 ^e (0-0,33)	0,54 ^c (0,29-0,79)

^a concordance excellente (0,81-1), ^b bonne (0,61-0,8), ^c modérée (0,41-0,6), ^d faible (0,21-0,4), ^e nulle (0-0,2)
 NC = neurocysticercose ; Groupe 1 = vésiculaire dans le parenchyme, 1a = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement .

4. Inflammation du LCR et sensibilité des différentes techniques

Nous avons déterminé le coefficient de corrélation entre les valeurs de densité optiques de 2 tests ELISA et le nombre de cellules. Il existe une corrélation positive entre le nombre de cellules et la DO du test ELISA-Ac ($p < 0,001$) et du test ELISA-Ag ($p = 0,0065$).

Le nombre médian de cellules est significativement différent en fonction du résultat du WB ($p < 0,001$) et de celui de la PCR ($p < 0,001$).

Ces résultats montrent qu'il existe une association entre les résultats des tests biologiques et l'inflammation du LCR.

Nous avons également regardé la présence des différentes bandes du western blot en fonction des groupes et de l'inflammation des prélèvements. Dans la population générale, nous avons trouvé une différence significative entre les échantillons inflammatoires et non inflammatoires concernant la présence de la bande de 12 kDa ($p=0,016$) (Tableau 16). Il n'y a pas de différence significative pour les 5 autres bandes. La présence de cette bande est peut-être liée à la réaction inflammatoire de l'hôte.

Tableau 16 : Fréquence (en pourcentage) de présence des différentes bandes (en kDa) dans les EITB positifs pour les différents groupes en fonction de l'inflammation.

	Bandes du Western blot						
	N (WB+)	6-8	12	23-26	39	45	50-55
NC confirmée							
Inflammatoire	69 (66)	97	50	98	100	68	100
Non Inflammatoire	48 (29)	72	10	100	93	34	86
<i>Groupe 1</i>							
Inflammatoire	39 (37)	97	54	100	100	68	100
Non Inflammatoire	10 (7)	86	29	100	100	71	86
<i>Groupe 1a</i>							
Inflammatoire	3 (2)	100	100	100	100	50	100
Non Inflammatoire	4 (2)	100	0	100	100	50	50
<i>Groupe 1b</i>							
Inflammatoire	36 (35)	97	51	100	100	69	100
Non Inflammatoire	6 (5)	80	20	100	100	80	100
<i>Groupe 2</i>							
Inflammatoire	4 (3)	100	67	67	100	33	100
Non Inflammatoire	2 (2)	50	0	100	100	0	100
<i>Groupe 3</i>							
Inflammatoire	8 (8)	100	50	100	100	62	100
Non Inflammatoire	22 (11)	64	9	73	91	9	82
<i>Groupe 4</i>							
Inflammatoire	13 (13)	92	46	100	100	77	100
Non Inflammatoire	6 (5)	80	0	100	100	60	80
<i>Groupe 5</i>							
Inflammatoire	5 (5)	100	20	100	100	80	100
Non Inflammatoire	8 (4)	75	0	100	75	25	100

NC = neurocysticercose ; groupe 1 = vésiculaire (1a = vésiculaire dans le parenchyme, 1b = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement. Inflammatoire > 5 cellules/ml de LCR

5. Evolution des tests au cours du suivi des patients

Douze patients ayant été suivi après traitement ne présentent aucun changement au niveau des résultats des tests diagnostiques. Il s'est produit un changement de profil chez 6 patients et un contrôle (Tableau 17).

Le test ELISA-Ag HP10 se négative chez 5 patients (A, B, C, D et E). Les données sur le traitement ne sont pas disponibles pour tous les patients. Le test est positif pour tous les échantillons avec des cysticerques vésiculaires quelle que soit la localisation. Pour les tests de détection d'anticorps (ELISA-Ac et EITB), les résultats des tests restent positifs au cours du suivi. Ceci s'explique par la persistance des anticorps.

Pour la PCR, deux personnes présentent des changements de profil. La première (F) se négative ; il s'agit d'un contrôle, femme qui présentait des kystes avec une épilepsie généralisée. La date du dernier prélèvement n'est pas précisée mais la patiente étant encore âgée de 17 ans, seuls quelques mois ont pu s'écouler. La deuxième personne (G) est une patiente qui change de profil au cours de son suivi à 3 mois. La PCR devient positive. A l'imagerie, il n'y a plus de cysticerques au stade vésiculaire mais seulement colloïdal. En revanche, aucune information n'est disponible sur un traitement éventuel.

Tableau 17 : Détail du suivi de 6 patients et un contrôle.

Patients	N°	Date	Résultat	Stade	Groupe	Traitement
A	1	29/03/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire ESA	1b	0
	2	30/01/07	ELISA-Ag négatif	Calcification	3	PDN
B	1	13/07/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire ESA	1b	ND
	2	28/04/06	ELISA-Ag négatif	Vésiculaire avec doute	4	PDN
C	1	31/08/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire avec doute	4	ND
	2	27/07/07	ELISA-Ag négatif	Vésiculaire avec doute	4	PDN
D	1	15/04/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire ESA	1b	0
	2	24/08/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire ESA	1b	ND
	3	14/02/05	ELISA-Ag positif	Vésiculaire ESA	1b	ND
	4	10/01/08	ELISA-Ag négatif	Vésiculaire avec doute	4	ND
E	1	31/03/04	ELISA-Ag positif	Vésiculaire parenchyme	1a	ND
	2	13/07/04	ELISA-Ag négatif	Colloïdal	2	0
F	1	10/08/05	PCR positive		Contrôle	PDN
	2	04/04/06	PCR positive		Contrôle	PDN
	3	ND	PCR négative		Contrôle	PDN
G	1	09/10/07	PCR négative	Vésiculaire ESA	1b	0
	2	09/01/08	PCR positive	Colloïdal	2	ND

ND : non déterminé ; ESA : espace sous-arachnoïdien ; PDN : prednisone

IV. Discussion

La PCR basée sur l'amplification du fragment pTsol9 du génome de *T. solium* détecte de 90,3 à 100% des cas de neurocysticercose selon le stade et la localisation du parasite. Cette technique a une sensibilité de 100% pour détecter des cysticerques au niveau du parenchyme cérébral.

La spécificité de la PCR est de 80% au lieu de 100% décrit par Almeida et al. Nous nous attendions à une meilleure spécificité du fait de l'utilisation d'amorces spécifiques dirigées contre une séquence particulière du génome de *T. solium*. Il est important de préciser qu'aucun des contrôles français n'était positif avec la PCR. On peut donc émettre deux hypothèses suite à ce constat : soit les contrôles mexicains ont été mal diagnostiqués (mais leur imagerie était négative), soit les échantillons sont de vrais faux positifs. Une possibilité serait de séquencer le fragment amplifié par PCR pour confirmer la séquence en plus de la taille du fragment. Deux de ces quatre prélèvements positifs provenaient de cas avec lésions inflammatoires et le traitement administré est précisé pour deux cas. Ces informations sont insuffisantes pour expliquer la positivité de la PCR.

L'explication la plus probable est que ces patients ont développé une neurocysticercose dans le passé, qu'ils étaient guéris au moment du prélèvement mais que l'ADN du parasite a persisté. En effet, nous ne disposons d'aucune information quant aux mécanismes qui conduisent au relargage d'ADN dans le LCR. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre ce processus et d'évaluer la persistance de l'ADN dans le LCR des patients.

Les résultats obtenus pour les autres tests immunologiques sont en accord avec les études précédentes. En ce qui concerne, l'ELISA HP10, nous avons confirmé que cette technique a une excellente spécificité (100%) et une très bonne sensibilité pour détecter les cysticerques vésiculaires dans l'ESA ou les ventricules (86,4%) alors qu'une localisation parenchymateuse limite sa sensibilité. Cependant, dans notre étude, la valeur de la sensibilité pour détecter des parasites vésiculaires dans le parenchyme est supérieure (42% vs 0%) à celle publiée précédemment (Bobes et al., 2006).

La raison de ce résultat est obscure mais comme deux des trois prélèvements positifs étaient des LCR inflammatoires, nous ne pouvons écarter la possibilité de la présence de cysticerques dans l'espace sous arachnoïdien qui n'auraient pas été identifiés à l'imagerie (normalement les parasites dans le parenchyme ne sont pas associés avec une inflammation du LCR). Nous avons également confirmé que la sensibilité de ce test pour détecter des parasites endommagés ou mort est très faible.

Les résultats obtenus pour la détection d'anticorps avec la méthode ELISA dans le cas de cysticerques vésiculaires (sensibilité de 97,7% dans l'espace sous-arachnoïdien ou les ventricules et 85,7% dans le parenchyme) sont similaires à ceux d'une précédente étude (Fleury et al., 2007). Cette technique permet de détecter la présence de parasites indépendamment de la viabilité du parasite. Cependant, sa valeur comme outil diagnostique reste limitée par la persistance des anticorps.

La sensibilité et la spécificité du test EITB ont été déterminées à 98 et 100% respectivement (Tsang et al., 1989). Une évaluation clinique réalisée sur 50 patients atteints de neurocysticercose a montré une sensibilité de 91% dans le cas de neurocysticercose active et de 88% pour des cysticerques calcifiés (Wilson et al., 1991). Ces valeurs sont proches de celles que nous avons obtenues (90,2% et 61,3% respectivement). La fréquence des bandes du western blot varie en fonction des groupes ou de l'inflammation des prélèvements. Les bandes 23-26 kDa et 39 kDa sont les plus fréquentes alors que les bandes de 12kDa et 45 kDa sont présentes respectivement dans 38% et 57% des bandelettes du western blot. Nous n'avons pas identifié d'association entre la présence des différentes bandes et les groupes. Une étude antérieure avait mis en évidence une association entre la présence d'une fraction de 13-14 kDa avec la présence de vésicules (Simac et al., 1994).

Il est intéressant de noter que les sensibilités des 2 techniques de détection d'anticorps ne sont pas significativement différentes quel que soit le groupe étudié. Cette observation diffère du résultat de certaines études (Prabhakaran et al., 2004 ; Scheel et al., 2005) mais d'autres sont en accord (Ferrer et al., 2002 ; Parija et Gireesh, 2009). Les raisons de ces différences sont encore inconnues et méritent d'être mieux comprises. Cependant, pour le moment, le test EITB est principalement utilisé comme test de confirmation du test ELISA-Ac.

Tous les résultats des tests diagnostiques semblent associés avec le nombre de cellules dans le LCR. Les valeurs de densité optique des 2 tests ELISA sont positivement corrélées avec la cellularité. Ce résultat a été montré dans d'autres études (Bobes et al., 2006 ; Fleury et al., 2003) dans lesquelles l'inflammation du CSF était associée avec le taux d'antigène HP10 avec des valeurs d'OR de 30 et 32 respectivement.

Cinq patients ont été exclus de cette étude car le diagnostic, basé sur l'imagerie, était incertain. Mais nous devons rappeler qu'à l'heure actuelle aucun test de référence n'est disponible pour le diagnostic de la neurocysticercose. Bien que l'imagerie ou l'EITB soient souvent considérés comme les tests de référence pour le diagnostic de la neurocysticercose, le diagnostic reste basé sur un faisceau d'argument et est classé en catégorie : certain, probable et possible. Trois de ces patients sont intéressants pour évaluer l'apport de l'imagerie en comparaison aux tests biologiques.

Pour l'un d'entre eux, les 4 tests biologiques étaient positifs. Ce patient avait une lésion au niveau du tronc cérébral. Malheureusement, il n'est jamais revenu à l'hôpital donc aucune information supplémentaire n'est disponible.

Pour le second patient, tous les tests étaient positifs sauf le test ELISA pour la détection d'antigène. Il n'y avait pas de parasite visible à l'imagerie mais ce patient souffrait d'une hypertension intracrânienne inexplicée.

Le troisième patient était une femme de 46 ans pour laquelle nous disposions de 4 prélèvements sur une période de 9 mois. Les 3 premiers prélèvements ont été réalisés dans les 2 premiers mois de son suivi et le dernier prélèvement 8 mois plus tard. La PCR était positive pour 2 des 3 premiers prélèvements. Huit mois plus tard, lors du dernier contrôle, 3 tests biologiques sont revenus positifs, seul l'ELISA-Ag est resté négatif. La présentation clinique de cette patiente était des vertiges et de l'anxiété.

Ces cas apportent donc des informations quant à la limite de l'imagerie et sur l'utilité d'un panel de tests biologiques dans certains cas de neurocysticercose. En effet, il peut arriver que l'imagerie ne permette pas l'identification de tous les parasites. Le dernier cas montre l'utilité de la PCR qui a été le premier test à détecter le parasite. Deux autres tests se sont positivés au cours du suivi, ce qui semble confirmer une cysticercose.

V. Conclusion

Le diagnostic de la neurocysticercose se base sur une combinaison de critères (imagerie, biologie, clinique et épidémiologie) (Del Brutto et al., 1996). La détection d'ADN de *T. solium* dans le LCR peut être ajoutée comme nouveau test biologique. Cette méthode pourrait être utilisée en combinaison avec les tests immunologiques, notamment en zone d'endémie où les méthodes radiologiques sont difficilement accessibles ou peuvent échouer à la détection du parasite.

Il semble indispensable de poursuivre les recherches dans cette voie. Nous devons étudier plus particulièrement la persistance de l'ADN dans le LCR pour évaluer sa validité dans le suivi des patients après traitement. Il serait également important de comprendre les mécanismes qui conduisent au relargage d'ADN dans le LCR.

Le développement de technique de PCR sur le sérum ou le sang des patients est également envisageable. Récemment, une équipe a mis au point une PCR sur le sérum de porc (Ramahefarisoa et al., 2010). Cette méthode permet un diagnostic ante mortem des animaux mais la sensibilité de la technique est seulement de 64%.

Les tests immunologiques à la recherche d'antigène ou d'anticorps restent indispensables pour évaluer la prévalence de la cysticercose humaine et porcine, de la taeniasse et de la neurocysticercose dans les pays dits endémiques. Les études séroépidémiologiques sont nécessaires pour avoir une vision globale de l'impact de ce complexe et surtout pour la mise en place de programme de lutte adéquat pouvant aboutir à l'éradication de ce parasite.

Conclusion et Perspectives

Le travail que nous avons réalisé sur l'évolution de *T. solium* et des deux autres vers solitaires rencontrés chez l'homme (*T. saginata* et *T. asiatica*), nous a permis de mieux comprendre la biogéographie de ces parasites. Nous avons pu observer l'influence des hôtes sur l'évolution et la diversification de ces parasites. Le travail doit être poursuivi et réalisé sur un plus grand nombre de gènes. Le projet mexicain de séquençage du génome de *T. solium* va permettre de compléter et d'approfondir ces recherches (Aguilar-Diaz et al., 2006). Il serait également intéressant de travailler sur d'autres types de marqueurs tels que les microsatellites afin d'étudier les variations génétiques sur une échelle de temps plus réduite.

L'hétérogénéité clinique de la neurocysticercose dépend de l'interaction complexe entre le parasite, ses hôtes et l'environnement. En effet, la fréquence et l'intensité d'exposition ainsi que la nutrition sont des facteurs environnementaux qui peuvent jouer un rôle dans la variation clinique de la maladie. Plusieurs facteurs de l'hôte définitif ont été identifiés : l'âge, le sexe, la génétique ainsi que la réponse immunitaire (Fleury et al., 2010). Comme nous l'avons dit précédemment, le stade, la localisation et le nombre de parasite sont associés avec l'expression clinique. L'évolution différente du parasite selon les localisations suggère l'implication de la différenciation génétique dans la distribution tissulaire des cysticerques mais également dans les divers degrés de gravité de la maladie selon les continents. L'évolution du parasite est liée aux migrations et aux comportements alimentaires de ses hôtes. Les événements majeurs de diversification des *Taenia* semblent liés aux changements d'hôtes. Toutes ces observations ont conduit à l'hypothèse que les différentes manifestations cliniques de la cysticercose seraient liées au génotype de *T. solium* (Nakao et al., 2002).

Récemment, une étude a été réalisée afin de déterminer l'origine de l'infection d'un patient opéré pour une neurocysticercose (Yanagida et al., 2010). D'après l'analyse du gène *cox1*, ce patient japonais se serait contaminé dix ans avant l'apparition des symptômes lors d'un séjour au Népal. Cette étude ouvre les possibilités d'identifier l'origine de l'infection et d'étudier des marqueurs génétiques de souches responsables de la neurocysticercose.

Au contraire de *T. solium*, *T. saginata*, ne peut pas causer de cysticercose chez l'homme. La restriction du stade larvaire de *T. saginata* uniquement chez les bovins peut avoir limité la diversification du parasite. Dans le cycle de développement de *T. solium*, la cysticercose humaine est considérée comme une impasse parasitaire.

Le cannibalisme serait donc nécessaire à la transmission interhumaine directe de *T. solium*. Cette hypothèse a été proposée par Baer en 1940 (Baer, 1940). Plusieurs preuves d'anthropophagie ont été décrites sur des fossiles humains datant du Pléistocène (780 000 ans) (Fernandez-Jalvo et al., 1996).

Le cannibalisme était une pratique répandue à l'époque Néanderthaliennne (Defleur et al., 1999). Il a été décrit comme une voie possible de transmission des maladies dans différentes espèces animales et chez l'homme (Rudolf et Antonovics, 2007). Les hommes ont la structure sociale et les pratiques culturelles qui permettent la propagation des maladies par le cannibalisme. Ces pratiques étaient encore courantes en Papouasie Nouvelle Guinée au siècle dernier. Des recherches anthropologiques réalisées sur la maladie de Kuru ont conduit à l'hypothèse du rôle du cannibalisme dans la transmission de l'agent infectieux (Lindenbaum, 2009). L'hypothèse de la transmission interhumaine de *T. solium* par le cannibalisme a été reprise par Hoberg (Hoberg et al., 2001). Le cannibalisme nous permet d'émettre une nouvelle hypothèse : la cysticercose chez l'homme (considéré comme un hôte intermédiaire dans ce cas) serait à l'origine de variations génétiques spécifiques selon l'origine géographique des souches. Le cannibalisme aurait donc joué un rôle important dans la transmission du parasite entre êtres humains et permis une diversification spécifique de l'ancêtre de *T. solium*.

Nous venons de voir que l'homme a pu jouer le rôle d'hôte intermédiaire pendant une période mais qu'il a ensuite été remplacé par les porcs qui présentent plusieurs avantages pour la transmission de *T. solium*. Les cas de cysticercose humaine actuels sont accidentels et ne transmettent plus le parasite. La comparaison des formes de neurocysticercose entre les hommes et les porcs suggère aussi une meilleure adaptation du parasite aux porcs (Saenz et al., 2008). En effet, les cysticerques au stade vésiculaire sont prédominants dans le cerveau de porc tandis que des formes dégénérées ou calcifiées sont plus fréquentes chez l'homme.

Cette différence peut être due à la plus grande disponibilité de l'hôte intermédiaire porcin. Les barrières physiques du cerveau humain limitent l'accès au parasite. L'influence qu'a pu jouer l'homme, en tant qu'hôte intermédiaire, sur la diversification de *T. solium* date de l'époque où le cannibalisme était une pratique courante permettant la poursuite du cycle. La cysticerose humaine serait donc une trace du comportement cannibale de l'homme à cette époque.

Autrement dit, nous pouvons supposer que la complexité de la biologie humaine et les variations génétiques entre les différentes populations humaines (Européen, Africain, Américain et Asiatique) pourraient être responsables de la diversification spécifique de *T. solium*.

Nos travaux de recherche sur le diagnostic de la maladie, en particulier ceux faisant appel à la biologie moléculaire, doivent être poursuivis. En effet, la mise au point d'une PCR dans le sang serait une avancée considérable pour le diagnostic de la cysticerose. Il est donc important d'identifier d'autres marqueurs moléculaires à visée diagnostic qui permettraient de distinguer les géotypes de *T. solium*. Ces marqueurs devront ensuite être validés comme outil diagnostique dans le domaine de la clinique. La mise au point d'une telle technique permettrait peut-être de confirmer le lien entre le géotype de *T. solium* et les différentes formes cliniques de la cysticerose. C'est en cela que les variations génétiques que nous avons identifiées, spécialement chez *T. solium*, seront très utiles.

Références bibliographiques

- Achilli, A., Bonfiglio, S., Olivieri, A., Malusa, A., Pala, M., Kashani, B.H., Perego, U.A., Ajmone-Marsan, P., Liotta, L., Semino, O., Bandelt, H.J., Ferretti, L., Torroni, A., 2009. The multifaceted origin of taurine cattle reflected by the mitochondrial genome. *PLoS One* 4, e5753.
- Aguilar-Diaz, H., Bobes, R.J., Carrero, J.C., Camacho-Carranza, R., Cervantes, C., Cevallos, M.A., Davila, G., Rodriguez-Dorantes, M., Escobedo, G., Fernandez, J.L., Fragoso, G., Gaytan, P., Garciarubio, A., Gonzalez, V.M., Gonzalez, L., Jose, M.V., Jimenez, L., Laclette, J.P., Landa, A., Larralde, C., Morales-Montor, J., Morett, E., Ostoa-Saloma, P., Sciutto, E., Santamaria, R.I., Soberon, X., de la Torre, P., Valdes, V., Yanez, J., 2006. The genome project of *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55 Suppl, S127-130.
- Allan, J.C., Avila, G., Garcia Noval, J., Flisser, A., Craig, P.S., 1990. Immunodiagnosis of taeniasis by coproantigen detection. *Parasitology* 101 Pt 3, 473-477.
- Allan, J.C., Wilkins, P.P., Tsang, V.C., Craig, P.S., 2003. Immunodiagnostic tools for taeniasis. *Acta Trop* 87, 87-93.
- Allibert, C., 2007. Migration austronésienne et mise en place de la civilisation malgache. *Diogenes* 218, 6-17.
- Almeida, C.R., Ojopi, E.P., Nunes, C.M., Machado, L.R., Takayanagui, O.M., Livramento, J.A., Abraham, R., Gattaz, W.F., Vaz, A.J., Dias-Neto, E., 2006. *Taenia solium* DNA is present in the cerebrospinal fluid of neurocysticercosis patients and can be used for diagnosis. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 256, 307-310.
- Alves, E., Ovilo, C., Rodriguez, M.C., Sillio, L., 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Anim Genet* 34, 319-324.
- Andrianjafy, 1910. Cysticercose humaine. *Bull Soc Sci Med Madagascar* 2, 53-60.
- Andriantsimahavandy, A., Lesbordes, J.L., Rasoaharimalala, B., Peghini, M., Rabarijaona, L., Roux, J., Boisier, P., 1997. Neurocysticercosis: a major aetiological factor of late-onset epilepsy in Madagascar. *Trop Med Int Health* 2, 741-746.
- Andriantsimahavandy, A., Ravaoalimalala, V.E., Rajaonarison, P., Ravoniarimbina, P., Rakotondrazaka, M., Raharilaza, N., Rakotoarivelo, D., Ratsitorahina, M., Rabarijaona, L.P., Ramarokoto, C.E., Leutscher, P., Migliani, R., 2003. Situation épidémiologique actuelle de la cysticercose à Madagascar. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 69, 46-51.
- Anton, S.C., Leonard, W.R., Robertson, M.L., 2002. An ecomorphological model of the initial hominid dispersal from Africa. *J Hum Evol* 43, 773-785.
- Argue, D., Morwood, M.J., Sutikna, T., Jatmiko, Saptomo, E.W., 2009. *Homo floresiensis*: a cladistic analysis. *J Hum Evol* 57, 623-639.
- Baer, C.F., Miyamoto, M.M., Denver, D.R., 2007. Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nat Rev Genet* 8, 619-631.
- Baer, J., G., 1940. The origin of human tapeworms. *J Parasitol* 26, 127-134.
- Bailey, J.F., Richards, M.B., Macaulay, V.A., Colson, I.B., James, I.T., Bradley, D.G., Hedges, R.E., Sykes, B.C., 1996. Ancient DNA suggests a recent expansion of European cattle from a diverse wild progenitor species. *Proc Biol Sci* 263, 1467-1473.
- Barcelos, I.S., Mineo, J.R., de Oliveira Silva, D.A., Ferreira, M.S., de Moura, L.P., Biondi, G.F., Costa-Cruz, J.M., 2001. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. *Trop Med Int Health* 6, 219-226.

- Beja-Pereira, A., Caramelli, D., Lalueza-Fox, C., Vernesi, C., Ferrand, N., Casoli, A., Goyache, F., Royo, L.J., Conti, S., Lari, M., Martini, A., Ouragh, L., Magid, A., Atash, A., Zsolnai, A., Boscato, P., Triantaphylidis, C., Ploumi, K., Sineo, L., Mallegni, F., Taberlet, P., Erhardt, G., Sampietro, L., Bertranpetit, J., Barbujani, G., Luikart, G., Bertorelle, G., 2006. The origin of European cattle: evidence from modern and ancient DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8113-8118.
- Bellwood, P., 1991. The austronesian dispersal and the origin of languages. *Scientific american* 265, 88-93.
- Bern, C., Garcia, H.H., Evans, C., Gonzalez, A.E., Verastegui, M., Tsang, V.C., Gilman, R.H., 1999. Magnitude of the disease burden from neurocysticercosis in a developing country. *Clin Infect Dis* 29, 1203-1209.
- Bininda-Emonds, O.R., Gittleman, J.L., Purvis, A., 1999. Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biol Rev Camb Philos Soc* 74, 143-175.
- Bobes, R.J., Hernandez, M., Marquez, C., Fragoso, G., Garcia, E., Parkhouse, R.M., Harrison, L.J., Sciutto, E., Fleury, A., 2006. Subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis: application of an antigen detection assay for the diagnosis and follow-up. *Trop Med Int Health* 11, 943-950.
- Bobes, R.J., Fragoso, G., Reyes-Montes Mdel, R., Duarte-Escalante, E., Vega, R., de Aluja, A.S., Zuniga, G., Morales, J., Larralde, C., Sciutto, E., 2010. Genetic diversity of *Taenia solium* cysticerci from naturally infected pigs of central Mexico. *Vet Parasitol* 168, 130-135.
- Bowles, J., McManus, D.P., 1994. Genetic characterization of the Asian *Taenia*, a newly described taeniid cestode of humans. *Am J Trop Med Hyg* 50, 33-44.
- Bradley, D.G., MacHugh, D.E., Cunningham, P., Loftus, R.T., 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5131-5135.
- Brown, P., Sutikna, T., Morwood, M.J., Soejono, R.P., Jatmiko, Saptomo, E.W., Due, R.A., 2004. A new small-bodied hominin from the Late Pleistocene of Flores, Indonesia. *Nature* 431, 1055-1061.
- Bruschi, F., Masetti, M., Locci, M.T., Ciranni, R., Fornaciari, G., 2006. Short report: cysticercosis in an Egyptian mummy of the late Ptolemaic period. *Am J Trop Med Hyg* 74, 598-599.
- Bryant, J.E., Holmes, E.C., Barrett, A.D., 2007. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog* 3, e75.
- Bryc, K., Auton, A., Nelson, M.R., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., Williams, S., Froment, A., Bodo, J.M., Wambebe, C., Tishkoff, S.A., Bustamante, C.D., 2010. Genome-wide patterns of population structure and admixture in West Africans and African Americans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 786-791.
- Burneo, J.G., Plener, I., Garcia, H.H., 2009. Neurocysticercosis in a patient in Canada. *CMAJ* 180, 639-642.
- Burney, D.A., Burney, L.P., Godfrey, L.R., Jungers, W.L., Goodman, S.M., Wright, H.T., Jull, A.J., 2004. A chronology for late prehistoric Madagascar. *J Hum Evol* 47, 25-63.
- Burt, D.W., 2009. The cattle genome reveals its secrets. *J Biol* 8, 36.
- Cabaret, J., Geerts, S., Madeline, M., Ballandonne, C., Barbier, D., 2002. The use of urban sewage sludge on pastures: the cysticercosis threat. *Vet Res* 33, 575-597.
- Campbell, G., Garcia, H.H., Nakao, M., Ito, A., Craig, P.S., 2006. Genetic variation in *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55 Suppl, S121-126.

- Campos, R.H., Mbayed, V.A., Pineiro, Y.L.F.G., 2005. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Latin America. *J Clin Virol* 34 Suppl 2, S8-S13.
- Carpio, A., Placencia, M., Santillan, F., Escobar, A., 1994. A proposal for classification of neurocysticercosis. *Can J Neurol Sci* 21, 43-47.
- Carpio, A., Escobar, A., Hauser, W.A., 1998. Cysticercosis and epilepsy: a critical review. *Epilepsia* 39, 1025-1040.
- Cavalli-Sforza, L.L., Edwards, A.W., 1967. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am J Hum Genet* 19, 233-257.
- Chapman, A., Vallejo, V., Mossie, K.G., Ortiz, D., Agabian, N., Flisser, A., 1995. Isolation and characterization of species-specific DNA probes from *Taenia solium* and *Taenia saginata* and their use in an egg detection assay. *J Clin Microbiol* 33, 1283-1288.
- Ciochon, R.L., Bettis, E.A., 3rd, 2009. Palaeoanthropology: Asian *Homo erectus* converges in time. *Nature* 458, 153-154.
- Corona, T., Pascoe, D., Gonzalez-Barranco, D., Abad, P., Landa, L., Estanol, B., 1986. Anticysticercous antibodies in serum and cerebrospinal fluid in patients with cerebral cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 49, 1044-1049.
- Correa, D., Sandoval, M.A., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Plancarte, A., Meza-Lucas, A., Flisser, A., 1989. Human neurocysticercosis: comparison of enzyme immunoassay capture techniques based on monoclonal and polyclonal antibodies for the detection of parasite products in cerebrospinal fluid. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 83, 814-816.
- Davis, B.W., Li, G., Murphy, W.J., 2010. Supermatrix and species tree methods resolve phylogenetic relationships within the big cats, *Panthera* (Carnivora: Felidae). *Mol Phylogenet Evol* 56, 64-76.
- de Aluja, A.S., 2008. Cysticercosis in the pig. *Curr Top Med Chem* 8, 368-374.
- de Meeus, T., Michalakis, Y., Renaud, F., 1998. Santa rosalia revisited: or why are there so many kinds of parasites in 'the garden of earthly delights'? *Parasitol Today* 14, 10-13.
- de Queiroz, A., Alkire, N.L., 1998. The phylogenetic placement of *Taenia* cestodes that parasitize humans. *J Parasitol* 84, 379-383.
- Deckers, N., Saerens, D., Kanobana, K., Conrath, K., Victor, B., Wernery, U., Vercruysse, J., Muyldermans, S., Dorny, P., 2009. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. *Int J Parasitol* 39, 625-633.
- Deckers, N., Dorny, P., 2010. Immunodiagnosis of *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis. *Trends Parasitol* 26, 137-144.
- Defleur, A., White, T., Valensi, P., Slimak, L., Cregut-Bonnouere, E., 1999. Neanderthal cannibalism at Moula-Guercy, Ardeche, France. *Science* 286, 128-131.
- DeGiorgio, C., Pietsch-Escueta, S., Tsang, V., Corral-Leyva, G., Ng, L., Medina, M.T., Astudillo, S., Padilla, N., Leyva, P., Martinez, L., Noh, J., Levine, M., del Villasenor, R., Sorvillo, F., 2005. Sero-prevalence of *Taenia solium* cysticercosis and *Taenia solium* taeniasis in California, USA. *Acta Neurol Scand* 111, 84-88.
- Del Brutto, O.H., Santibanez, R., Noboa, C.A., Aguirre, R., Diaz, E., Alarcon, T.A., 1992. Epilepsy due to neurocysticercosis: analysis of 203 patients. *Neurology* 42, 389-392.
- Del Brutto, O.H., Wadia, N.H., Dumas, M., Cruz, M., Tsang, V.C., Schantz, P.M., 1996. Proposal of diagnostic criteria for human cysticercosis and neurocysticercosis. *J Neurol Sci* 142, 1-6.

- Del Brutto, O.H., Rajshekhar, V., White, A.C., Jr., Tsang, V.C., Nash, T.E., Takayanagui, O.M., Schantz, P.M., Evans, C.A., Flisser, A., Correa, D., Botero, D., Allan, J.C., Sarti, E., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Garcia, H.H., 2001. Proposed diagnostic criteria for neurocysticercosis. *Neurology* 57, 177-183.
- Del Brutto, O.H., 2005. Neurocysticercosis. *Semin Neurol* 25, 243-251.
- del la Garza, Y., Graviss, E.A., Daver, N.G., Gambarin, K.J., Shandera, W.X., Schantz, P.M., White, A.C., Jr., 2005. Epidemiology of neurocysticercosis in Houston, Texas. *Am J Trop Med Hyg* 73, 766-770.
- deMenocal, P.B., 1995. Plio-Pleistocene African climate. *Science* 270, 53-59.
- Dennell, R., 2003. Dispersal and colonisation, long and short chronologies: how continuous is the Early Pleistocene record for hominids outside East Africa? *J Hum Evol* 45, 421-440.
- Dennell, R., Roebroeks, W., 2005. An Asian perspective on early human dispersal from Africa. *Nature* 438, 1099-1104.
- Dewar, R., E., Wright, H.T., 1993. The culture history of Madagascar. *J World Prehistory* 7, 417-466.
- Dewar, R., E., 2003. Vertebrate extinctions. In: Goodman, S.M., Benstead, J.P. (Eds.), *The Natural History of Madagascar*. University of Chicago Press, Chicago ; London, pp. 119-122.
- Dorny, P., Brandt, J., Zoli, A., Geerts, S., 2003. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Trop* 87, 79-86.
- Dorny, P., Phiri, I.K., Vercruyse, J., Gabriel, S., Willingham, A.L., 3rd, Brandt, J., Victor, B., Speybroeck, N., Berkvens, D., 2004. A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *Int J Parasitol* 34, 569-576.
- Dorny, P., Praet, N., 2007. *Taenia saginata* in Europe. *Vet Parasitol* 149, 22-24.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4, e88.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7, 214.
- Edwards, C.J., Bollongino, R., Scheu, A., Chamberlain, A., Tresset, A., Vigne, J.D., Baird, J.F., Larson, G., Ho, S.Y., Heupink, T.H., Shapiro, B., Freeman, A.R., Thomas, M.G., Arbogast, R.M., Arndt, B., Bartosiewicz, L., Benecke, N., Budja, M., Chaix, L., Choyke, A.M., Coqueugniot, E., Dohle, H.J., Goldner, H., Hartz, S., Helmer, D., Herzig, B., Hongo, H., Mashkour, M., Ozdogan, M., Pucher, E., Roth, G., Schade-Lindig, S., Schmolcke, U., Schulting, R.J., Stephan, E., Uerpmann, H.P., Voros, I., Voytek, B., Bradley, D.G., Burger, J., 2007. Mitochondrial DNA analysis shows a Near Eastern Neolithic origin for domestic cattle and no indication of domestication of European aurochs. *Proc Biol Sci* 274, 1377-1385.
- Eertmans, A., Baeyens, F., Van den Bergh, O., 2001. Food likes and their relative importance in human eating behavior: review and preliminary suggestions for health promotion. *Health education research* 16, 443-456.
- Endicott, P., Ho, S.Y., Metspalu, M., Stringer, C., 2009. Evaluating the mitochondrial timescale of human evolution. *Trends Ecol Evol* 24, 515-521.
- Engels, D., Urbani, C., Belotto, A., Meslin, F., Savioli, L., 2003. The control of human (neuro)cysticercosis: which way forward? *Acta Trop* 87, 177-182.
- Eom, K.S., Rim, H.J., 1992. Natural infections of Asian *Taenia saginata* metacestodes in the livers of Korean domestic pigs. *Kisaengchunghak Chapchi* 30, 15-20.

- Eom, K.S., Rim, H.J., Geerts, S., 1992. Experimental infection of pigs and cattle with eggs of Asian *Taenia saginata* with special reference to its extrahepatic viscerotropism. *Kisaengchunghak Chapchi* 30, 269-275.
- Eom, K.S., Rim, H.J., 1993. Morphologic descriptions of *Taenia asiatica* sp. n. *Korean J Parasitol* 31, 1-6.
- Eom, K.S., Rim, H.J., 2001. Epidemiological understanding of *Taenia* tapeworm infections with special reference to *Taenia asiatica* in Korea. *Korean J Parasitol* 39, 267-283.
- Eom, K.S., 2006. What is Asian *Taenia*? *Parasitol Int* 55 Suppl, S137-141.
- Eom, K.S., Jeon, H.K., Rim, H.J., 2009. Geographical distribution of *Taenia asiatica* and related species. *Korean J Parasitol* 47 Suppl, S115-124.
- Escobedo, F., Penagos, P., Rodriguez, J., Sotelo, J., 1987. Albendazole therapy for neurocysticercosis. *Arch Intern Med* 147, 738-741.
- Espindola, N.M., Iha, A.H., Fernandes, I., Takayanagui, O.M., Machado Ldos, R., Livramento, J.A., Mendes Maia, A.A., Peralta, J.M., Vaz, A.J., 2005. Cysticercosis immunodiagnosis using 18- and 14-kilodalton proteins from *Taenia crassiceps* cysticercus antigens obtained by immunoaffinity chromatography. *J Clin Microbiol* 43, 3178-3184.
- Esterre, P., Andriantsimahavandy, A., Boisier, P., 1994. Relations entre pathologie et immunité dans la cysticercose. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 61, 14-20.
- Fan, P.C., Chung, W.C., Soh, C.T., Kosman, M.L., 1992. Eating habits of east Asian people and transmission of taeniasis. *Acta Trop* 50, 305-315.
- Fan, P.C., Chung, W.C., Lin, C.Y., Wu, C.C., 2006. Pig as a favorable animal for *Taenia saginata asiatica* infection. *Kaohsiung J Med Sci* 22, 1-13.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J Mol Evol* 17, 368-376.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.
- Felsenstein, J., 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package). Department of Genome Science, University of Washington, Seattle.
- Fernandez-Jalvo, Y., Diez, J.C., Bermudez de Castro, J.M., Carbonell, E., Arsuaga, J.L., 1996. Evidence of early cannibalism. *Science* 271, 277-278.
- Ferrer, E., Cortez, M.M., Perez, H., De la Rosa, M., de Noya, B.A., D'Avila, I., Harrison, L.J., Foster-Cuevas, M., Parkhouse, R.M., Cabrera, A., 2002. Serological evidence for recent exposure to *Taenia solium* in Venezuelan Amerindians. *Am J Trop Med Hyg* 66, 170-174.
- Fleury, A., Hernandez, M., Fragoso, G., Parkhouse, R.M., Harrison, L.J., Sciutto, E., 2003. Detection of secreted cysticercal antigen: a useful tool in the diagnosis of inflammatory neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 542-546.
- Fleury, A., Desein, A., Preux, P.M., Dumas, M., Tapia, G., Larralde, C., Sciutto, E., 2004. Symptomatic human neurocysticercosis--age, sex and exposure factors relating with disease heterogeneity. *J Neurol* 251, 830-837.
- Fleury, A., Hernandez, M., Avila, M., Cardenas, G., Bobes, R.J., Huerta, M., Fragoso, G., Uribe-Campero, L., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Sciutto, E., 2007. Detection of HP10 antigen in serum for diagnosis and follow-up of subarachnoidal and intraventricular human neurocysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 970-974.
- Fleury, A., Escobar, A., Fragoso, G., Sciutto, E., Larralde, C., 2010. Clinical heterogeneity of human neurocysticercosis results from complex interactions among parasite, host and environmental factors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 104, 243-250.

- Flisser, A., Sarti, E., Lightowers, M., Schantz, P., 2003. Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop* 87, 43-51.
- Flisser, A., Rodriguez-Canul, R., Willingham, A.L., 3rd, 2006. Control of the taeniosis/cysticercosis complex: future developments. *Vet Parasitol* 139, 283-292.
- Gabunia, L., Vekua, A., Lordkipanidze, D., Swisher, C.C., 3rd, Ferring, R., Justus, A., Nioradze, M., Tvalchrelidze, M., Anton, S.C., Bosinski, G., Joris, O., Lumley, M.A., Majsuradze, G., Mouskhelishvili, A., 2000. Earliest Pleistocene hominid cranial remains from Dmanisi, Republic of Georgia: taxonomy, geological setting, and age. *Science* 288, 1019-1025.
- Galan-Puchades, M.T., Fuentes, M.V., 2004. *Taenia asiatica* intermediate hosts. *Lancet* 363, 660.
- Garcia, H.H., Gilman, R.H., Catacora, M., Verastegui, M., Gonzalez, A.E., Tsang, V.C., 1997. Serologic evolution of neurocysticercosis patients after antiparasitic therapy. Cysticercosis Working Group in Peru. *J Infect Dis* 175, 486-489.
- Garcia, H.H., Del Brutto, O.H., 2000. *Taenia solium* cysticercosis. *Infect Dis Clin North Am* 14, 97-119, ix.
- Garcia, H.H., Evans, C.A., Nash, T.E., Takayanagui, O.M., White, A.C., Jr., Botero, D., Rajshekhar, V., Tsang, V.C., Schantz, P.M., Allan, J.C., Flisser, A., Correa, D., Sarti, E., Friedland, J.S., Martinez, S.M., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Del Brutto, O.H., 2002. Current consensus guidelines for treatment of neurocysticercosis. *Clin Microbiol Rev* 15, 747-756.
- Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Evans, C.A., Gilman, R.H., 2003. *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362, 547-556.
- Garcia, H.H., Del Brutto, O.H., Nash, T.E., White, A.C., Jr., Tsang, V.C., Gilman, R.H., 2005. New concepts in the diagnosis and management of neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Am J Trop Med Hyg* 72, 3-9.
- Gasser, R.B., Zhu, X., McManus, D.P., 1999. NADH dehydrogenase subunit 1 and cytochrome c oxidase subunit I sequences compared for members of the genus *Taenia* (Cestoda). *Int J Parasitol* 29, 1965-1970.
- Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2002. An insect molecular clock dates the origin of the insects and accords with palaeontological and biogeographic landmarks. *Mol Biol Evol* 19, 748-761.
- Giuffra, E., Kijas, J.M., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T., Andersson, L., 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* 154, 1785-1791.
- Goncalves, M.L., Araujo, A., Ferreira, L.F., 2003. Human intestinal parasites in the past: new findings and a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98 Suppl 1, 103-118.
- Goncalves, V.F., Carvalho, C.M., Bortolini, M.C., Bydlowski, S.P., Pena, S.D., 2008. The phylogeography of African Brazilians. *Hum Hered* 65, 23-32.
- Gonzalez, A.E., Cama, V., Gilman, R.H., Tsang, V.C., Pilcher, J.B., Chavera, A., Castro, M., Montenegro, T., Verastegui, M., Miranda, E., et al., 1990. Prevalence and comparison of serologic assays, necropsy, and tongue examination for the diagnosis of porcine cysticercosis in Peru. *Am J Trop Med Hyg* 43, 194-199.
- Gonzalez, A.E., Falcon, N., Gavidia, C., Garcia, H.H., Tsang, V.C., Bernal, T., Romero, M., Gilman, R.H., 1998. Time-response curve of oxfendazole in the treatment of swine cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 59, 832-836.

- Gonzalez, A.E., Verastegui, M., Noh, J.C., Gavidia, C., Falcon, N., Bernal, T., Garcia, H.H., Tsang, V.C., Gilman, R.H., Wilkins, P.P., 1999. Persistence of passively transferred antibodies in porcine *Taenia solium* cysticercosis. Cysticercosis Working Group in Peru. *Vet Parasitol* 86, 113-118.
- Gonzalez, A.E., Gauci, C.G., Barber, D., Gilman, R.H., Tsang, V.C., Garcia, H.H., Verastegui, M., Lightowers, M.W., 2005. Vaccination of pigs to control human neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 72, 837-839.
- Gonzalez, A.E., Lopez-Urbina, T., Tsang, B., Gavidia, C., Garcia, H.H., Silva, M.E., Ramos, D.D., Manzanedo, R., Sanchez-Hidalgo, L., Gilman, R.H., Tsang, V.C., 2006. Transmission dynamics of *Taenia solium* and potential for pig-to-pig transmission. *Parasitol Int* 55 Suppl, S131-135.
- Gonzalez, L.M., Montero, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 2000. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infection by PCR. *J Clin Microbiol* 38, 737-744.
- Gonzalez, L.M., Montero, E., Puente, S., Lopez-Velez, R., Hernandez, M., Sciutto, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 2002a. PCR tools for the differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis from different geographical locations. *Diagn Microbiol Infect Dis* 42, 243-249.
- Gonzalez, L.M., Montero, E., Sciutto, E., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 2002b. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia solium* infections: from DNA probes to polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96 Suppl 1, S243-250.
- Gonzalez, L.M., Montero, E., Morakote, N., Puente, S., Diaz De Tuesta, J.L., Serra, T., Lopez-Velez, R., McManus, D.P., Harrison, L.J., Parkhouse, R.M., Garate, T., 2004. Differential diagnosis of *Taenia saginata* and *Taenia saginata asiatica* taeniasis through PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 49, 183-188.
- Goodman, S.M., Ganzhorn, J., U., Rakotondravony, D., 2003. Introductions of the mammals. In: Goodman, S.M., Benstead, J.P. (Eds.), *The Natural History of Madagascar*. University of Chicago Press, Chicago, London.
- Gotherstrom, A., Anderung, C., Hellborg, L., Elburg, R., Smith, C., Bradley, D.G., Ellegren, H., 2005. Cattle domestication in the Near East was followed by hybridization with aurochs bulls in Europe. *Proc Biol Sci* 272, 2345-2350.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52, 696-704.
- Gunz, P., Bookstein, F.L., Mitteroecker, P., Stadlmayr, A., Seidler, H., Weber, G.W., 2009. Early modern human diversity suggests subdivided population structure and a complex out-of-Africa scenario. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 6094-6098.
- Hall, T., A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp* 41, 95-98.
- Hancock, K., Broughel, D.E., Moura, I.N., Khan, A., Pieniazek, N.J., Gonzalez, A.E., Garcia, H.H., Gilman, R.H., Tsang, V.C., 2001. Sequence variation in the cytochrome oxidase I, internal transcribed spacer 1, and Ts14 diagnostic antigen sequences of *Taenia solium* isolates from South and Central America, India, and Asia. *Int J Parasitol* 31, 1601-1607.
- Hancock, K., Khan, A., Williams, F.B., Yushak, M.L., Pattabhi, S., Noh, J., Tsang, V.C., 2003. Characterization of the 8-kilodalton antigens of *Taenia solium* metacestodes and evaluation of their use in an enzyme-linked immunosorbent assay for serodiagnosis. *J Clin Microbiol* 41, 2577-2586.

- Hancock, K., Pattabhi, S., Greene, R.M., Yushak, M.L., Williams, F., Khan, A., Priest, J.W., Levine, M.Z., Tsang, V.C., 2004. Characterization and cloning of GP50, a *Taenia solium* antigen diagnostic for cysticercosis. *Mol Biochem Parasitol* 133, 115-124.
- Handali, S., Klarman, M., Gaspard, A.N., Noh, J., Lee, Y.M., Rodriguez, S., Gonzalez, A.E., Garcia, H.H., Gilman, R.H., Tsang, V.C., Wilkins, P.P., 2010. Multiantigen print immunoassay for comparison of diagnostic antigens for *Taenia solium* cysticercosis and taeniasis. *Clin Vaccine Immunol* 17, 68-72.
- Harrison, L.J., Joshua, G.W., Wright, S.H., Parkhouse, R.M., 1989. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol* 11, 351-370.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., 1997. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Hassanin, A., Ropiquet, A., 2004. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937. *Mol Phylogenet Evol* 33, 896-907.
- Hawk, M.W., Shahlaie, K., Kim, K.D., Theis, J.H., 2005. Neurocysticercosis: a review. *Surg Neurol* 63, 123-132; discussion 132.
- Hennig, W., 1966. Phylogenetic systematics. Urbana: University of Illinois Press, Etats-Unis.
- Hernandez, M., Gonzalez, L.M., Fleury, A., Saenz, B., Parkhouse, R.M., Harrison, L.J., Garate, T., Sciutto, E., 2008. Neurocysticercosis: detection of *Taenia solium* DNA in human cerebrospinal fluid using a semi-nested PCR based on HDP2. *Ann Trop Med Parasitol* 102, 317-323.
- Hiendleder, S., Lewalski, H., Janke, A., 2008. Complete mitochondrial genomes of *Bos taurus* and *Bos indicus* provide new insights into intra-species variation, taxonomy and domestication. *Cytogenet Genome Res* 120, 150-156.
- Hinojosa-Juarez, A.C., Sandoval-Balanzario, M., McManus, D.P., Monroy-Ostria, A., 2008. Genetic similarity between cysticerci of *Taenia solium* isolated from human brain and from pigs. *Infect Genet Evol* 8, 653-656.
- Ho, S.Y., Larson, G., Edwards, C.J., Heupink, T.H., Lakin, K.E., Holland, P.W., Shapiro, B., 2008. Correlating Bayesian date estimates with climatic events and domestication using a bovine case study. *Biol Lett* 4, 370-374.
- Hoberg, E.P., Jones, A., Rausch, R.L., Eom, K.S., Gardner, S.L., 2000. A phylogenetic hypothesis for species of the genus *Taenia* (Eucestoda : Taeniidae). *J Parasitol* 86, 89-98.
- Hoberg, E.P., Alkire, N.L., de Queiroz, A., Jones, A., 2001. Out of Africa: origins of the *Taenia* tapeworms in humans. *Proc Biol Sci* 268, 781-787.
- Hoberg, E.P., 2002. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. *Microbes Infect* 4, 859-866.
- Hoberg, E.P., 2006. Phylogeny of *Taenia*: Species definitions and origins of human parasites. *Parasitol Int* 55 Suppl, S23-30.
- Huerta, M., Avila, R., Jimenez, H.I., Diaz, R., Diaz, J., Diaz Huerta, M.E., Hernandez, M., Martinez, J.J., Garate, T., Gomez, E., Abad, T., Fragoso, G., Fleury, A., Sciutto, E., 2008. Parasite contamination of soil in households of a Mexican rural community endemic for neurocysticercosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 374-379.
- Hughes, J.K., Haywood, A., Mithen, S.J., Sellwood, B.W., Valdes, P.J., 2007. Investigating early hominin dispersal patterns: developing a framework for climate data integration. *J Hum Evol* 53, 465-474.

- Hume, J.C., Lyons, E.J., Day, K.P., 2003. Human migration, mosquitoes and the evolution of *Plasmodium falciparum*. Trends Parasitol 19, 144-149.
- Hurles, M.E., Sykes, B.C., Jobling, M.A., Forster, P., 2005. The dual origin of the Malagasy in Island Southeast Asia and East Africa: evidence from maternal and paternal lineages. Am J Hum Genet 76, 894-901.
- ITFDE, 1993. Recommendations of the International Task Force for Disease Eradication. MMWR Recomm Rep 42, 1-38.
- Ito, A., Nakao, M., Wandra, T., 2003a. Human taeniasis and cysticercosis in Asia. Lancet 362, 1918-1920.
- Ito, A., Yamasaki, H., Nakao, M., Sako, Y., Okamoto, M., Sato, M.O., Nakaya, K., Margono, S.S., Ikejima, T., Kassuku, A.A., Afonso, S.M., Ortiz, W.B., Plancarte, A., Zoli, A., Geerts, S., Craig, P.S., 2003b. Multiple genotypes of *Taenia solium*--ramifications for diagnosis, treatment and control. Acta Trop 87, 95-101.
- Ito, A., Wandra, T., Yamasaki, H., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Margono, S.S., Suroso, T., Gauci, C., Lightowers, M.W., 2004. Cysticercosis/taeniasis in Asia and the Pacific. Vector Borne Zoonotic Dis 4, 95-107.
- Jeon, H.K., Eom, K.S., 2006. *Taenia asiatica* and *Taenia saginata*: genetic divergence estimated from their mitochondrial genomes. Exp Parasitol 113, 58-61.
- Johnson, W.E., Eizirik, E., Pecon-Slattery, J., Murphy, W.J., Antunes, A., Teeling, E., O'Brien, S.J., 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. Science 311, 73-77.
- Joshua, G.W., Harrison, L.J., Sewell, M.M., 1990. Protein antigens in the cyst fluid of *Taenia saginata* cysticerci. Parasitology 100 Pt 3, 463-467.
- Jung, H., Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M.T., Sotelo, J., 1990. Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. Clin Neuropharmacol 13, 559-564.
- Klein, R.G., 2008. Out of Africa and the evolution of human behavior. Evol Anthropol 17, 267-281.
- Klein, R.G., 2009. Darwin and the recent African origin of modern humans. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 16007-16009.
- Koepfli, K.P., Jenks, S.M., Eizirik, E., Zahirpour, T., Van Valkenburgh, B., Wayne, R.K., 2006. Molecular systematics of the Hyaenidae: relationships of a relictual lineage resolved by a molecular supermatrix. Mol Phylogenet Evol 38, 603-620.
- Kraft, R., 2007. Cysticercosis: an emerging parasitic disease. Am Fam Physician 76, 91-96.
- Krecek, R.C., 2005. Third meeting of the Cysticercosis Working Group in Eastern and Southern Africa takes place in Maputo. J S Afr Vet Assoc 76, 2-3.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 1994. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software for microcomputers. Comput Appl Biosci 10, 189-191.
- Kumar, S., 2005. Molecular clocks: four decades of evolution. Nat Rev Genet 6, 654-662.
- Larick, R., Ciochon, R., L., 1996. The African emergence and early Asian dispersals of the genus *Homo*. Am Sci 84, 538-551.
- Larralde, C., Laclette, J.P., Owen, C.S., Madrazo, I., Sandoval, M., Bojalil, R., Sciutto, E., Contreras, L., Arzate, J., Diaz, M.L., et al., 1986. Reliable serology of *Taenia solium* cysticercosis with antigens from cyst vesicular fluid: ELISA and hemagglutination tests. Am J Trop Med Hyg 35, 965-973.

- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L., Cooper, A., 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science* 307, 1618-1621.
- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J.D., Edwards, C.J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Balacescu, A., Dolman, G., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., Van Wijngaarden-Bakker, L., Masseti, M., Bradley, D.G., Cooper, A., 2007a. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15276-15281.
- Larson, G., Cucchi, T., Fujita, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Anderson, A., Rolett, B., Spriggs, M., Dolman, G., Kim, T.H., Thuy, N.T., Randi, E., Doherty, M., Due, R.A., Bollt, R., Djubiantono, T., Griffin, B., Intoh, M., Keane, E., Kirch, P., Li, K.T., Morwood, M., Pedrina, L.M., Piper, P.J., Rabett, R.J., Shooter, P., Van den Bergh, G., West, E., Wickler, S., Yuan, J., Cooper, A., Dobney, K., 2007b. Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 4834-4839.
- Lavikainen, A., Haukisalme, V., Lehtinen, M.J., Henttonen, H., Oksanen, A., Meri, S., 2008. A phylogeny of members of the family Taeniidae based on the mitochondrial *cox1* and *nad1* gene data. *Parasitology* 135, 1457-1467.
- Le, T.H., Blair, D., McManus, D.P., 2000. Mitochondrial genomes of human helminths and their use as markers in population genetics and phylogeny. *Acta Trop* 77, 243-256.
- Lei, C.Z., Chen, H., Zhang, H.C., Cai, X., Liu, R.Y., Luo, L.Y., Wang, C.F., Zhang, W., Ge, Q.L., Zhang, R.F., Lan, X.Y., Sun, W.B., 2006. Origin and phylogeographical structure of Chinese cattle. *Anim Genet* 37, 579-582.
- Lewis, M.E., 1997. Carnivoran paleoguilds of Africa: implications for hominid food procurement strategies. *J Hum Evol* 32, 257-288.
- Lightowlers, M.W., Colebrook, A.L., Gauci, C.G., Gauci, S.M., Kyngdon, C.T., Monkhouse, J.L., Vallejo Rodriguez, C., Read, A.J., Rolfe, R.A., Sato, C., 2003. Vaccination against cestode parasites: anti-helminth vaccines that work and why. *Vet Parasitol* 115, 83-123.
- Lightowlers, M.W., 2006. Vaccines against cysticercosis and hydatidosis: foundations in taeniid cestode immunology. *Parasitol Int* 55 Suppl, S39-43.
- Lindenbaum, S., 2009. Cannibalism, kuru and anthropology. *Folia Neuropathol* 47, 138-144.
- Lion, B., Michel, C., 2006. De la domestication au tabou: le cas des suidés au Proche-Orient ancien. *Maison de l'Archéologie et de l'Ethnologie*.
- Loftus, R.T., MacHugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M., Cunningham, P., 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2757-2761.
- Loftus, R.T., Ertugrul, O., Harba, A.H., El-Barody, M.A., MacHugh, D.E., Park, S.D., Bradley, D.G., 1999. A microsatellite survey of cattle from a centre of origin: the Near East. *Mol Ecol* 8, 2015-2022.
- Lovette, I.J., 2005. Glacial cycles and the tempo of avian speciation. *Trends Ecol Evol* 20, 57-59.
- Lucchini, V., Meijaard, E., Diong, C. H., Groves, C. P., Randi, E., 2005. New phylogenetic perspectives among species of South-east Asian wild pig (*Sus* sp.) based on mtDNA sequences and morphometric data. *J Zool* 266, 25-35.
- MacEachern, S., McEwan, J., Goddard, M., 2009. Phylogenetic reconstruction and the identification of ancient polymorphism in the Bovini tribe (Bovidae, Bovinae). *BMC Genomics* 10, 177.

- MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., Bradley, D.G., 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146, 1071-1086.
- Mafojane, N.A., Appleton, C.C., Krecek, R.C., Michael, L.M., Willingham, A.L., 3rd, 2003. The current status of neurocysticercosis in Eastern and Southern Africa. *Acta Trop* 87, 25-33.
- Maguire, J.H., 2004. Tapeworms and seizures--treatment and prevention. *N Engl J Med* 350, 215-217.
- Maravilla, P., Souza, V., Valera, A., Romero-Valdovinos, M., Lopez-Vidal, Y., Dominguez-Alpizar, J.L., Ambrosio, J., Kawa, S., Flisser, A., 2003. Detection of genetic variation in *Taenia solium*. *J Parasitol* 89, 1250-1254.
- Martinez-Hernandez, F., Jimenez-Gonzalez, D.E., Chenillo, P., Alonso-Fernandez, C., Maravilla, P., Flisser, A., 2009. Geographical widespread of two lineages of *Taenia solium* due to human migrations: can population genetic analysis strengthen this hypothesis? *Infect Genet Evol* 9, 1108-1114.
- Marty, P., Herzog, U., Marty-Jaussan, I., Le Fichoux, Y., Doucet, J., 1985. [2 cases of cysticercosis observed in Cameroon]. *Med Trop (Mars)* 45, 83-86.
- McDougall, I., Brown, F.H., Fleagle, J.G., 2005. Stratigraphic placement and age of modern humans from Kibish, Ethiopia. *Nature* 433, 733-736.
- Meri, T., Jokiranta, T.S., Granat, S., Collander, F., Valtonen, M., Meri, S., 1999. Diagnosis of atypical neurocysticercosis by polymerase chain reaction analysis: case report. *Clin Infect Dis* 28, 1331-1332.
- Mervis, B., Lotz, J.W., 1980. Computed tomography (CT) in parenchymatous cerebral cysticercosis. *Clin Radiol* 31, 521-528.
- Michelet, L., Carod, J.F., Rakontondrazaka, M., Ma, L., Gay, F., Dauga, C., 2010. The pig tapeworm *Taenia solium*, the cause of cysticercosis: Biogeographic (temporal and spatial) origins in Madagascar. *Mol Phylogenet Evol* 55, 744-750.
- Migliani, R., Rasolomaharo, M., Rajaonarison, P., Ravaoalimalala, V.E., Rabarijaona, L., Andriantsimahavandy, A., 2000. La cysticerose dans le port de Mahajanga: plus fréquente qu'on ne l'imagine! *Arch Inst Pasteur Madagascar* 66, 39-42.
- Milton, K., 2003. The critical role played by animal source foods in human (*Homo*) evolution. *J Nutr* 133, 3886S-3892S.
- Mithen, S., Reed, M., 2002. Stepping out: a computer simulation of hominid dispersal from Africa. *J Hum Evol* 43, 433-462.
- Mona, S., Randi, E., Tommaseo-Ponzetta, M., 2007. Evolutionary history of the genus *Sus* inferred from cytochrome b sequences. *Mol Phylogenet Evol* 45, 757-762.
- Monnier, L., Andrianjafy, 1910. Cysticerose humaine confluyente. *Bull Soc Sci Med Madagascar* 2, 27-29.
- Moore, A.C., Lutwick, L.I., Schantz, P.M., Pilcher, J.B., Wilson, M., Hightower, A.W., Chapnick, E.K., Abter, E.I., Grossman, J.R., Fried, J.A., et al., 1995. Seroprevalence of cysticercosis in an Orthodox Jewish community. *Am J Trop Med Hyg* 53, 439-442.
- Morales, J., Martinez, J.J., Manoutcharian, K., Hernandez, M., Fleury, A., Gevorkian, G., Acero, G., Blancas, A., Toledo, A., Cervantes, J., Maza, V., Quet, F., Bonnabau, H., de Aluja, A.S., Fragoso, G., Larralde, C., Sciutto, E., 2008a. Inexpensive anti-cysticercosis vaccine: S3Pvac expressed in heat inactivated M13 filamentous phage proves effective against naturally acquired *Taenia solium* porcine cysticercosis. *Vaccine* 26, 2899-2905.

- Morales, J., Martinez, J.J., Rosetti, M., Fleury, A., Maza, V., Hernandez, M., Villalobos, N., Fragoso, G., de Aluja, A.S., Larralde, C., Sciutto, E., 2008b. Spatial Distribution of *Taenia solium* Porcine Cysticercosis within a Rural Area of Mexico. PLoS Negl Trop Dis 2, e284.
- Myadagsuren, N., Davaajav, A., Wandra, T., Sandar, T., Ichinkhorloo, P., Yamasaki, H., Sako, Y., Nakao, M., Sato, M.O., Nakaya, K., Ito, A., 2007. Taeniasis in Mongolia, 2002-2006. Am J Trop Med Hyg 77, 342-346.
- Nakao, M., Okamoto, M., Sako, Y., Yamasaki, H., Nakaya, K., Ito, A., 2002. A phylogenetic hypothesis for the distribution of two genotypes of the pig tapeworm *Taenia solium* worldwide. Parasitology 124, 657-662.
- Nakao, M., Yanagida, T., Okamoto, M., Knapp, J., Nkouawa, A., Sako, Y., Ito, A., 2010. State-of-the-art Echinococcus and Taenia: phylogenetic taxonomy of human-pathogenic tapeworms and its application to molecular diagnosis. Infect Genet Evol 10, 444-452.
- Nash, T.E., 2003. Human case management and treatment of cysticercosis. Acta Trop 87, 61-69.
- Nguekam, J.P., Zoli, A.P., Zogo, P.O., Kamga, A.C., Speybroeck, N., Dorny, P., Brandt, J., Losson, B., Geerts, S., 2003. A seroepidemiological study of human cysticercosis in West Cameroon. Trop Med Int Health 8, 144-149.
- Nijman, I.J., D.C.J. van Boxtel, L.M. van Cann, Y. Marnoch, E. Cuppen, J.A. Lenstra 2008. Phylogeny of Y chromosomes from bovine species. Cladistics 24, 723-726.
- Nikitas, P., Nikita, E., 2005. A study of hominin dispersal out of Africa using computer simulations. J Hum Evol 49, 602-617.
- Nozais, J.-P., Detry, A., Danis, M., 1996. Traité de parasitologie médicale. Pradel, Paris.
- Odashima, N.S., Takayanagui, O.M., Figueiredo, J.F., 2002. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of IgG, IgM, IgE and IgA against *Cysticercus cellulosae* in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. Arq Neuropsiquiatr 60, 400-405.
- Oppenheimer, S., 2009. The great arc of dispersal of modern humans: Africa to Australia. Quaternary international 202, 2-13.
- Osborn, A.G., Preece, M.T., 2006. Intracranial cysts: radiologic-pathologic correlation and imaging approach. Radiology 239, 650-664.
- Osborne, A.H., Vance, D., Rohling, E.J., Barton, N., Rogerson, M., Fello, N., 2008. A humid corridor across the Sahara for the migration of early modern humans out of Africa 120,000 years ago. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 16444-16447.
- Pal, D.K., Carpio, A., Sander, J.W., 2000. Neurocysticercosis and epilepsy in developing countries. J Neurol Neurosurg Psychiatry 68, 137-143.
- Parija, S.C., Gireesh, A.R., 2009. A serological study of cysticercosis in patients with HIV. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 51, 185-189.
- Pawlowski, Z., Schultz, M.G., 1972. Taeniasis and cysticercosis (*Taenia saginata*). Adv Parasitol 10, 269-343.
- Pawlowski, Z., 2002. *Taenia solium*: Basic biology and transmission. In: Singh, G., Prabhakar, S. (Ed.), *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. CABI Publishing, New York, pp. 1-14.
- Pawlowski, Z., Allan, J., Sarti, E., 2005. Control of *Taenia solium* taeniasis/cysticercosis: from research towards implementation. Int J Parasitol 35, 1221-1232.
- Pawlowski, Z.S., 2006. Role of chemotherapy of taeniasis in prevention of neurocysticercosis. Parasitol Int 55 Suppl, S105-109.

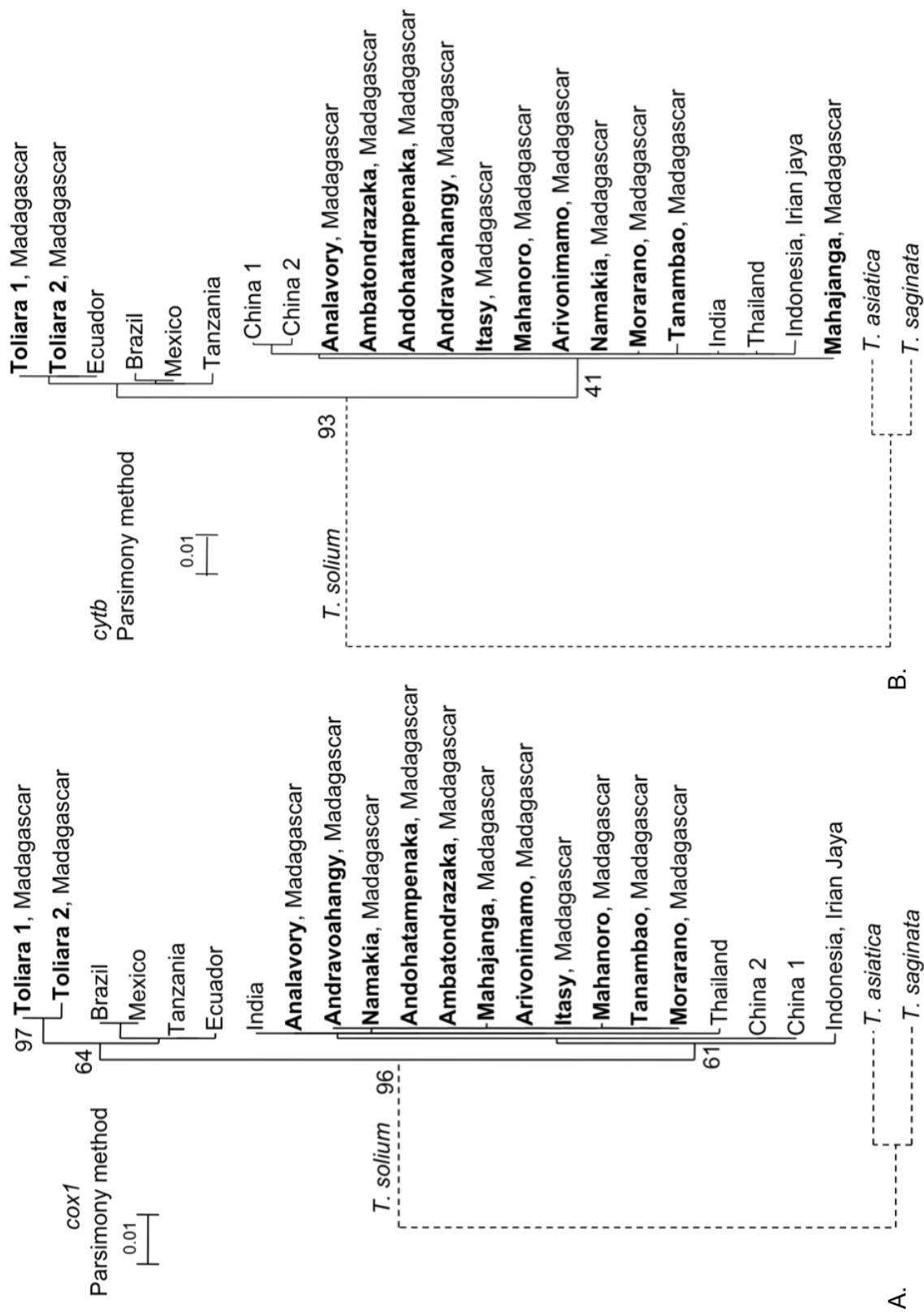
- Pawlowski, Z.S., 2008. Control of neurocysticercosis by routine medical and veterinary services. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102, 228-232.
- Phiri, I.K., Ngowi, H., Afonso, S., Matenga, E., Boa, M., Mukaratirwa, S., Githigia, S., Saimo, M., Sikasunge, C., Maingi, N., Lubega, G.W., Kassuku, A., Michael, L., Siziya, S., Krecek, R.C., Noormahomed, E., Vilhena, M., Dorny, P., Willingham, A.L., 3rd, 2003. The emergence of *Taenia solium* cysticercosis in Eastern and Southern Africa as a serious agricultural problem and public health risk. *Acta Trop* 87, 13-23.
- Pond, S.L., Frost, S.D., Muse, S.V., 2005. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21, 676-679.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Syst Biol* 50, 580-601.
- Posada, D., 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol Biol Evol* 25, 1253-1256.
- Pouedet, M.S., Zoli, A.P., Nguemkam, Vondou, L., Assana, E., Speybroeck, N., Berkvens, D., Dorny, P., Brandt, J., Geerts, S., 2002. Epidemiological survey of swine cysticercosis in two rural communities of West-Cameroon. *Vet Parasitol* 106, 45-54.
- Prabhakaran, V., Rajshekhar, V., Murrell, K.D., Oommen, A., 2004. *Taenia solium* metacestode glycoproteins as diagnostic antigens for solitary cysticercus granuloma in Indian patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 98, 478-484.
- Prasad, A., Prasad, K.N., Yadav, A., Gupta, R.K., Pradhan, S., Jha, S., Tripathi, M., Husain, M., 2008. Lymphocyte transformation test: a new method for diagnosis of neurocysticercosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 61, 198-202.
- Prasad, K.N., Chawla, S., Prasad, A., Tripathi, M., Husain, N., Gupta, R.K., 2006. Clinical signs for identification of neurocysticercosis in swine naturally infected with *Taenia solium*. *Parasitol Int* 55, 151-154.
- Rajaonarison, P., Ralamboson, S., Andriamamonjy, C., Ramanampamonjy, R., Ramanantoanina, C.E., Razafindratrio, F., Villeneuve, R., Andriantsimahavandy, A., 2001. [Diagnosis of neurocysticercosis: a case report]. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 67, 53-56.
- Rajshekhar, V., Joshi, D.D., Doanh, N.Q., van De, N., Xiaonong, Z., 2003. *Taenia solium* taeniosis/cysticercosis in Asia: epidemiology, impact and issues. *Acta Trop* 87, 53-60.
- Ramahefarisoa, R.M., Rakotondrazaka, M., Jambou, R., Carod, J.F., 2010. Comparison of ELISA and PCR assays for the diagnosis of porcine cysticercosis. *Vet Parasitol* doi:10.1016/j.vetpar.2010.05.002.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2007. Tracer v1.4.
- Rangel-Castilla, L., Serpa, J.A., Gopinath, S.P., Graviss, E.A., Diaz-Marchan, P., White, A.C., Jr., 2009. Contemporary neurosurgical approaches to neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 80, 373-378.
- Regueiro, M., Mirabal, S., Lacau, H., Caeiro, J.L., Garcia-Bertrand, R.L., Herrera, R.J., 2008. Austronesian genetic signature in East African Madagascar and Polynesia. *J Hum Genet* 53, 106-120.
- Reinhard, K.J., 1990. Archaeoparasitology in North America. *Am J Phys Anthropol* 82, 145-163.
- Renner, S.S., 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends Plant Sci* 10, 550-558.

- Roger, F., Ratovonjato, J., Vola, P., Uilenber, G., 2001. *Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar. *Exp Appl Acarol* 25, 263-269.
- Roman, G., Sotelo, J., Del Brutto, O., Flisser, A., Dumas, M., Wadia, N., Botero, D., Cruz, M., Garcia, H., de Bittencourt, P.R., Trelles, L., Arriagada, C., Lorenzana, P., Nash, T.E., Spina-Franca, A., 2000. A proposal to declare neurocysticercosis an international reportable disease. *Bull World Health Organ* 78, 399-406.
- Rudolf, V.H., Antonovics, J., 2007. Disease transmission by cannibalism: rare event or common occurrence? *Proc Biol Sci* 274, 1205-1210.
- Saenz, B., Ramirez, J., Aluja, A., Escobar, A., Fragoso, G., Morales, J., Perez-Tamayo, R., Rosetti, F., Larralde, C., Sciutto, E., Fleury, A., 2008. Human and porcine neurocysticercosis: differences in the distribution and developmental stages of cysticerci. *Trop Med Int Health* 13, 697-702.
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
- Sarti, E., Flisser, A., Schantz, P.M., Gleizer, M., Loya, M., Plancarte, A., Avila, G., Allan, J., Craig, P., Bronfman, M., Wijeyaratne, P., 1997. Development and evaluation of a health education intervention against *Taenia solium* in a rural community in Mexico. *Am J Trop Med Hyg* 56, 127-132.
- Schantz, P.M., Moore, A.C., Munoz, J.L., Hartman, B.J., Schaefer, J.A., Aron, A.M., Persaud, D., Sarti, E., Wilson, M., Flisser, A., 1992. Neurocysticercosis in an Orthodox Jewish community in New York City. *N Engl J Med* 327, 692-695.
- Schantz, P.M., 2002. *Taenia solium* cysticercosis: an overview of global distribution and transmission. In: Singh, G., Prabhakar, S. (Ed.), *Taenia solium* cysticercosis: from basic to clinical science. CABI publishing, New York, pp. 63-74.
- Scheel, C.M., Khan, A., Hancock, K., Garcia, H.H., Gonzalez, A.E., Gilman, R.H., Tsang, V.C., 2005. Serodiagnosis of neurocysticercosis using synthetic 8-kD proteins: comparison of assay formats. *Am J Trop Med Hyg* 73, 771-776.
- Sciutto, E., Fragoso, G., Fleury, A., Lacleste, J.P., Sotelo, J., Aluja, A., Vargas, L., Larralde, C., 2000. *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 Infect* 2, 1875-1890.
- Sianto, L., Chame, M., Silva, C.S., Goncalves, M.L., Reinhard, K., Fugassa, M., Araujo, A., 2009. Animal helminths in human archaeological remains: a review of zoonoses in the past. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51, 119-130.
- Simac, C., Michel, P., Andriantsimahavandy, A., Esterre, P., Michault, A., 1994. Intérêt du diagnostic immunologique par ELISA et EITB pour la conduite diagnostique et thérapeutique d'une neurocysticercose. *Arch Inst Pasteur Madagascar* 61, 21-27.
- Simanjuntak, G.M., Margono, S.S., Okamoto, M., Ito, A., 1997. Taeniasis/Cysticercosis in Indonesia as an emerging disease. *Parasitology Today* 13, 321-323.
- Soodyall, H., Jenkins, T., Stoneking, M., 1995. 'Polynesian' mtDNA in the Malagasy. *Nat Genet* 10, 377-378.
- Sotelo, J., Escobedo, F., Penagos, P., 1988. Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. A controlled trial. *Arch Neurol* 45, 532-534.
- Sotelo, J., del Brutto, O.H., Penagos, P., Escobedo, F., Torres, B., Rodriguez-Carbajal, J., Rubio-Donnadieu, F., 1990. Comparison of therapeutic regimen of anticysticercal drugs for parenchymal brain cysticercosis. *J Neurol* 237, 69-72.
- Stringer, C., 2000. Palaeoanthropology. Coasting out of Africa. *Nature* 405, 24-25, 27.

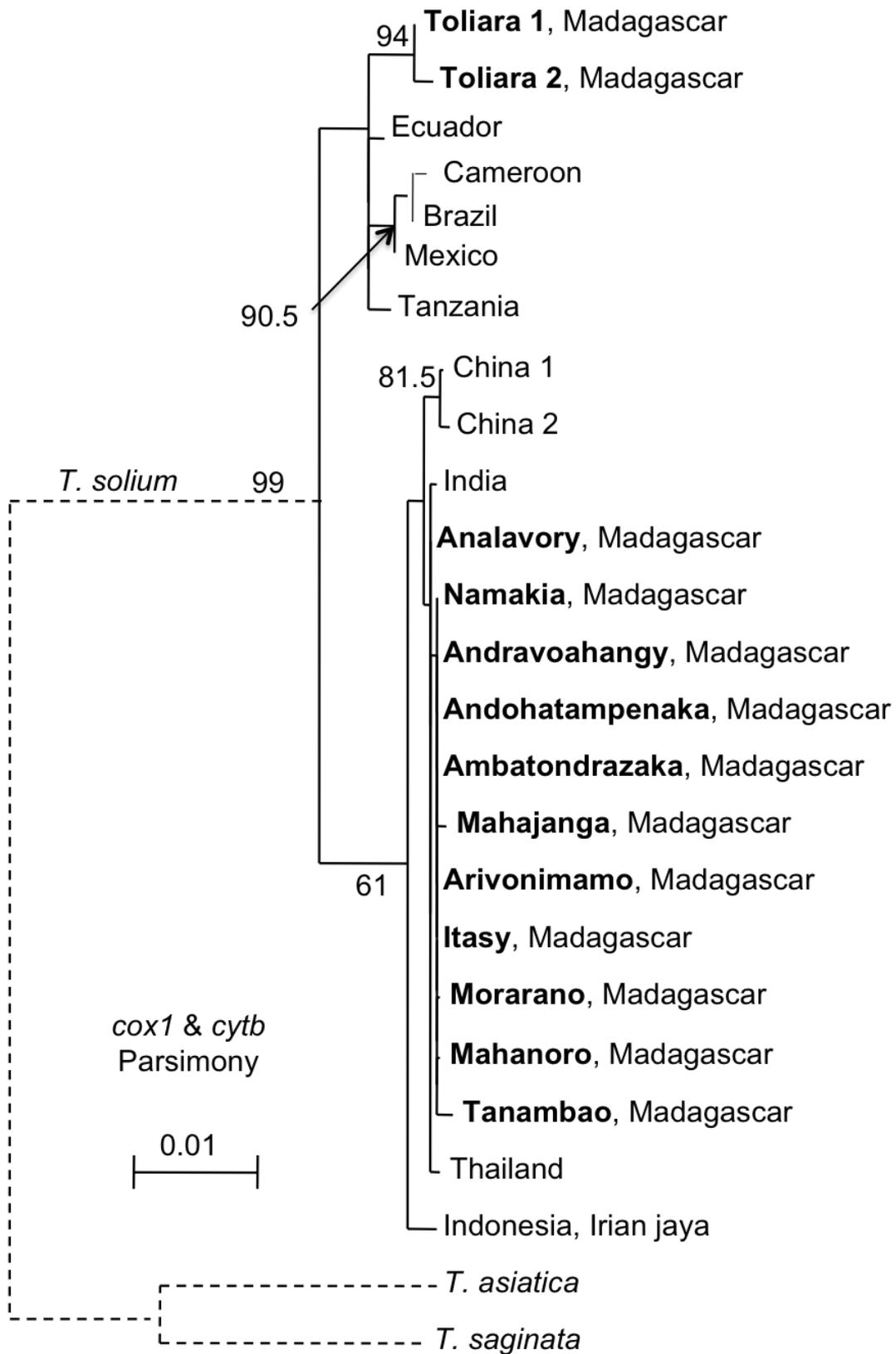
- Suss, R.A., Maravilla, K.R., Thompson, J., 1986. MR imaging of intracranial cysticercosis: comparison with CT and anatomopathologic features. *AJNR Am J Neuroradiol* 7, 235-242.
- Swisher, C.C., 3rd, Curtis, G.H., Jacob, T., Getty, A.G., Suprijo, A., Widiasmoro, 1994. Age of the earliest known hominids in Java, Indonesia. *Science* 263, 1118-1121.
- Swofford, D.L., 2000. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) 4.0 Beta. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Takayanagui, O.M., Odashima, N.S., 2006. Clinical aspects of neurocysticercosis. *Parasitol Int* 55 Suppl, S111-115.
- Templeton, A., 2002. Out of Africa again and again. *Nature* 416, 45-51.
- Theis, J.H., Cleary, M., Syvanen, M., Gilson, A., Swift, P., Banks, J., Johnson, E., 1996. DNA-confirmed *Taenia solium* cysticercosis in black bears (*Ursus americanus*) from California. *Am J Trop Med Hyg* 55, 456-458.
- Thompson, J.D., Plewniak, F., Poch, O., 1999. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs. *Nucleic Acids Res* 27, 2682-2690.
- Tishkoff, S.A., Reed, F.A., Friedlaender, F.R., Ehret, C., Ranciaro, A., Froment, A., Hirbo, J.B., Awomoyi, A.A., Bodo, J.M., Doumbo, O., Ibrahim, M., Juma, A.T., Kotze, M.J., Lema, G., Moore, J.H., Mortensen, H., Nyambo, T.B., Omar, S.A., Powell, K., Pretorius, G.S., Smith, M.W., Thera, M.A., Wambebe, C., Weber, J.L., Williams, S.M., 2009. The genetic structure and history of Africans and African Americans. *Science* 324, 1035-1044.
- Tsang, V.C., Brand, J.A., Boyer, A.E., 1989. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infect Dis* 159, 50-59.
- Vega, R., Pinero, D., Ramanankandrasana, B., Dumas, M., Bouteille, B., Fleury, A., Sciutto, E., Larralde, C., Fragoso, G., 2003. Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. *Int J Parasitol* 33, 1479-1485.
- Vigne, J.D., Zazzo, A., Saliege, J.F., Poplin, F., Guilaine, J., Simmons, A., 2009. Pre-Neolithic wild boar management and introduction to Cyprus more than 11,400 years ago. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16135-16138.
- Walter, R.C., Buffler, R.T., Bruggemann, J.H., Guillaume, M.M., Berhe, S.M., Negassi, B., Libsekal, Y., Cheng, H., Edwards, R.L., von Cosel, R., Neraudeau, D., Gagnon, M., 2000. Early human occupation of the Red Sea coast of Eritrea during the last interglacial. *Nature* 405, 65-69.
- Wayne, R.K., Van Valkenburgh, B., O'Brien, S.J., 1991. Molecular distance and divergence time in carnivores and primates. *Mol Biol Evol* 8, 297-319.
- Welch, J.J., Bromham, L., 2005. Molecular dating when rates vary. *Trends Ecol Evol* 20, 320-327.
- White, A.C., Jr., Robinson, P., Kuhn, R., 1997. *Taenia solium* cysticercosis: host-parasite interactions and the immune response. *Chem Immunol* 66, 209-230.
- White, T.D., Asfaw, B., DeGusta, D., Gilbert, H., Richards, G.D., Suwa, G., Howell, F.C., 2003. Pleistocene *Homo sapiens* from Middle Awash, Ethiopia. *Nature* 423, 742-747.
- Willingham, A.L., 3rd, Engels, D., 2006. Control of *Taenia solium* cysticercosis/taeniosis. *Adv Parasitol* 61, 509-566.
- Willingham, A.L., 3rd, Harrison, L.J., Fevre, E.M., Parkhouse, M.E., 2008. Inaugural meeting of the Cysticercosis Working Group in Europe. *Emerg Infect Dis* 14, e2.

- Wilson, M., Bryan, R.T., Fried, J.A., Ware, D.A., Schantz, P.M., Pilcher, J.B., Tsang, V.C., 1991. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer blot in patients with neurocysticercosis. *J Infect Dis* 164, 1007-1009.
- Wright, H.T., Rakotoarisoa, J., A., 2003. Rise of Malagasy societies. In: Goodman, S.M., Benstead, J.P. (Eds.), *The Natural History of Madagascar*. The University of Chicago Press, Chicago, London, pp. 112-178.
- Wu, G.S., Pang, J.F., Zhang, Y.P., 2006. Molecular phylogeny and phylogeography of Suidae. *Zool Res* 27, 197-201.
- Wu, G.S., Yao, Y.G., Qu, K.X., Ding, Z.L., Li, H., Palanichamy, M.G., Duan, Z.Y., Li, N., Chen, Y.S., Zhang, Y.P., 2007. Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biol* 8, R245.
- Yamasaki, H., Allan, J.C., Sato, M.O., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Qiu, D., Mamuti, W., Craig, P.S., Ito, A., 2004. DNA differential diagnosis of taeniasis and cysticercosis by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42, 548-553.
- Yamasaki, H., Nakao, M., Sako, Y., Nakaya, K., Sato, M.O., Ito, A., 2006. Mitochondrial DNA diagnosis for taeniasis and cysticercosis. *Parasitol Int* 55 Suppl, S81-85.
- Yanagida, T., Yuzawa, I., Joshi, D.D., Sako, Y., Nakao, M., Nakaya, K., Kawano, N., Oka, H., Fujii, K., Ito, A., 2010. Neurocysticercosis: assessing where the infection was acquired from. *J Travel Med* 17, 206-208.
- Zoli, A., Shey-Njila, O., Assana, E., Nguekam, J.P., Dorny, P., Brandt, J., Geerts, S., 2003a. Regional status, epidemiology and impact of *Taenia solium* cysticercosis in Western and Central Africa. *Acta Trop* 87, 35-42.
- Zoli, A.P., Nguekam, Shey-Njila, O., Nsame Nforinwe, D., Speybroeck, N., Ito, A., Sato, M.O., Dorny, P., Brandt, J., Geerts, S., 2003b. Neurocysticercosis and epilepsy in Cameroon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97, 683-686.

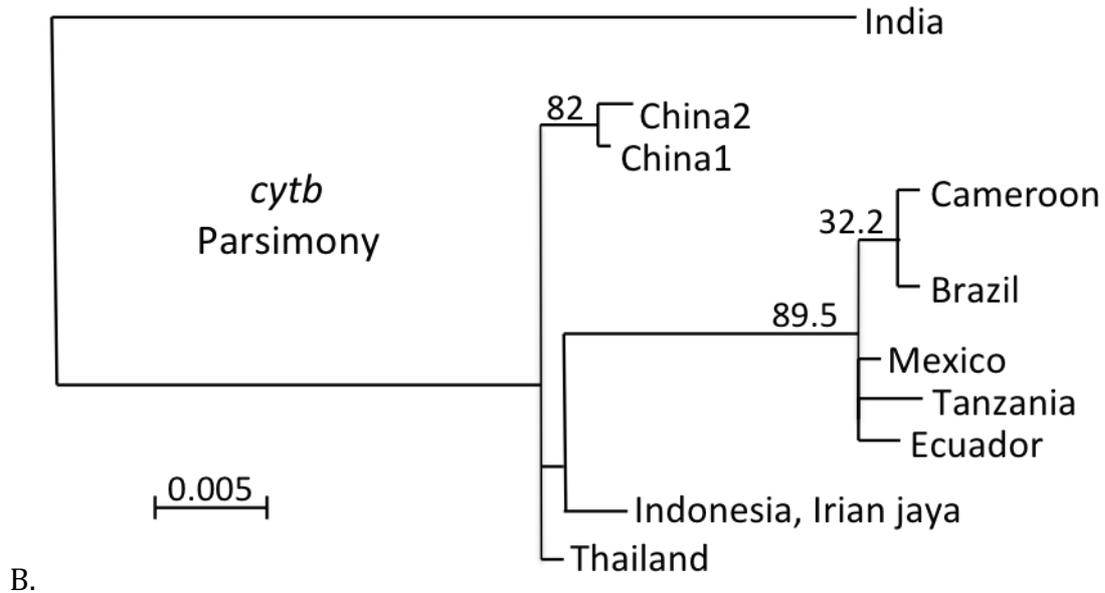
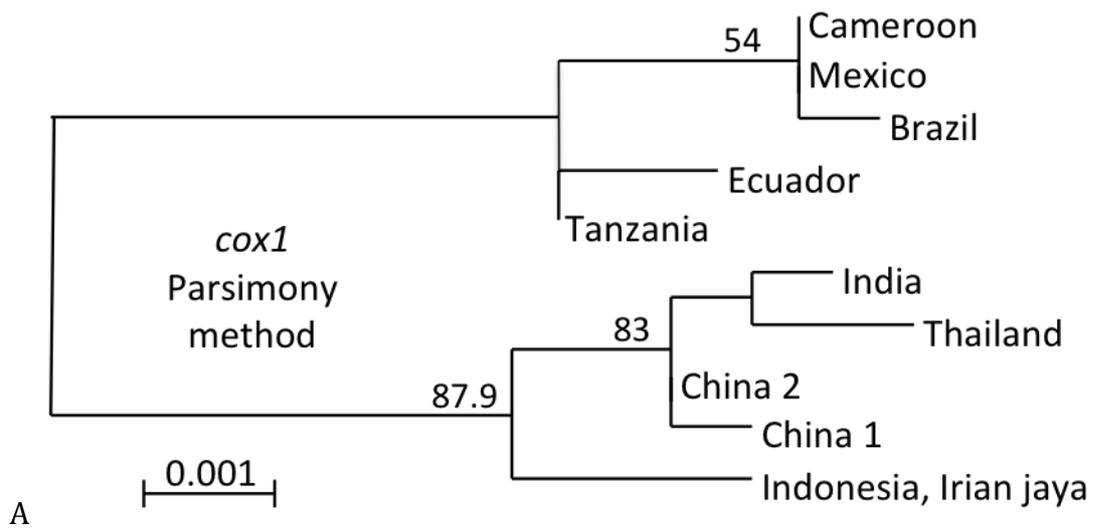
Annexes



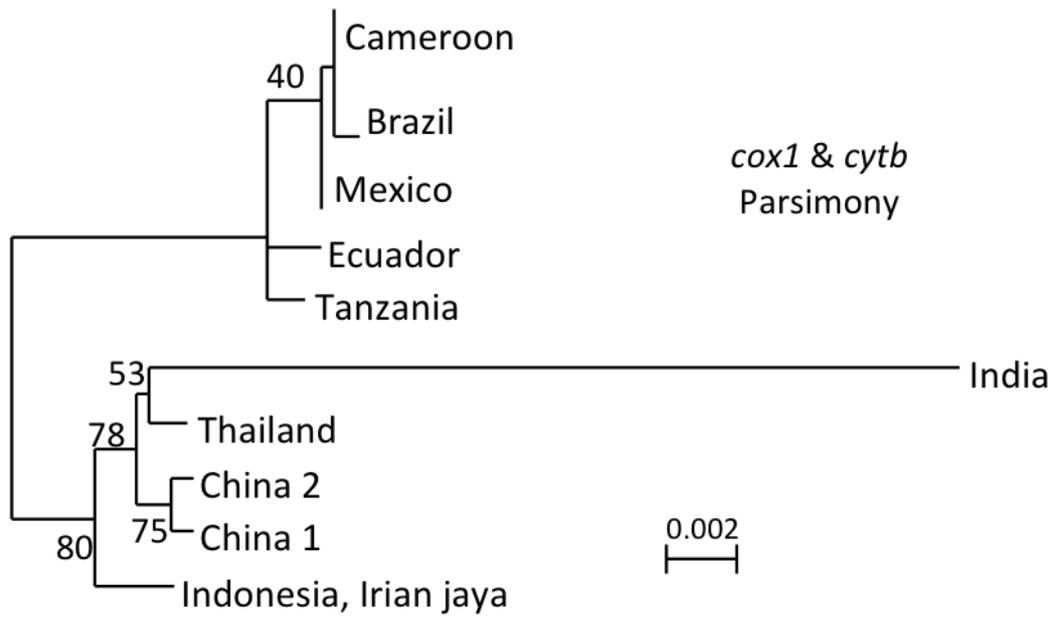
Annexe1 : Arbres *cox1* (A) et *cytb* (B) avec la méthode de parcimonie de *T. solium* de Madagascar



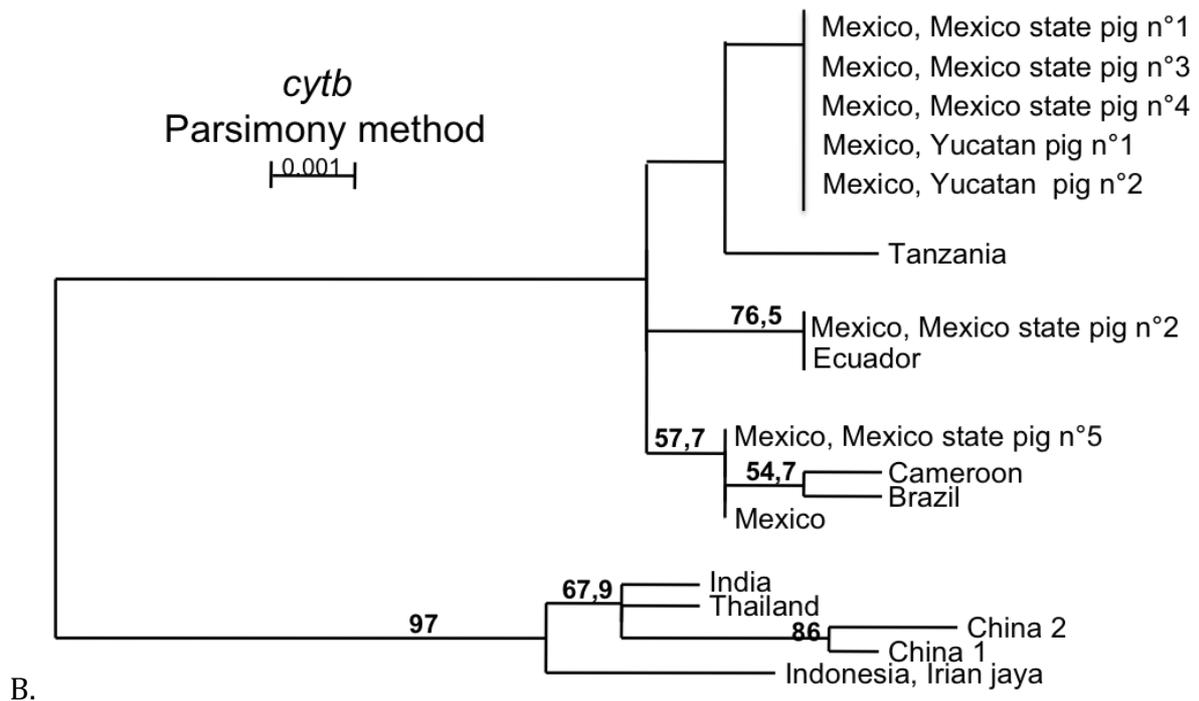
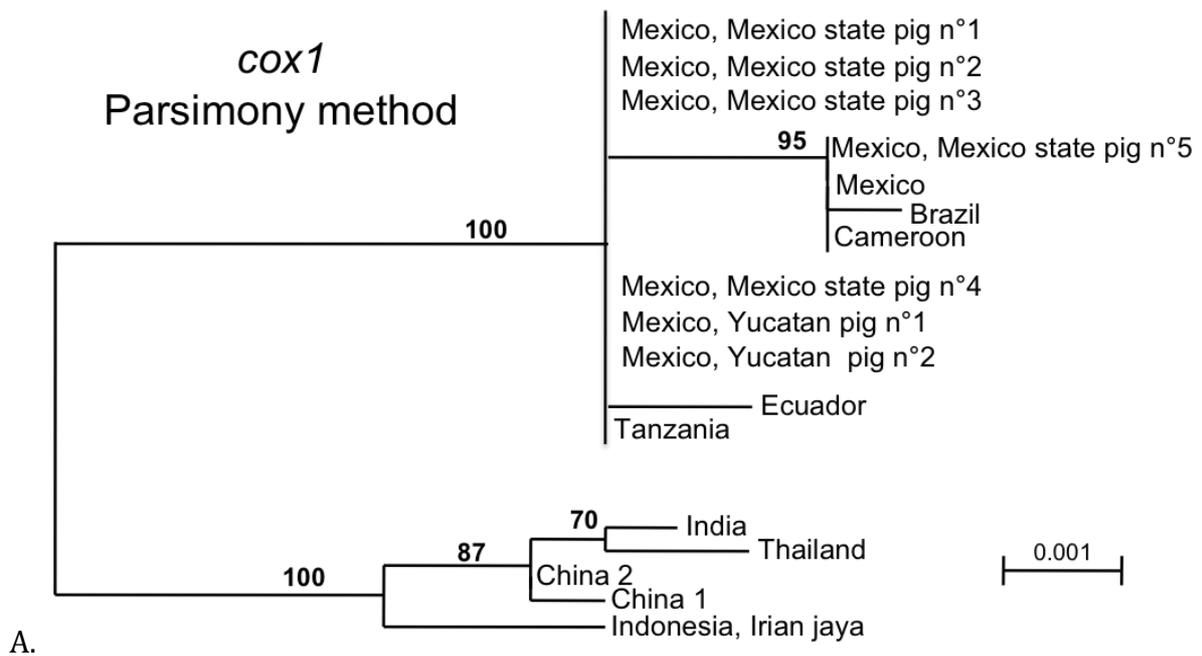
Annexe 2 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de *T. solium* de Madagascar



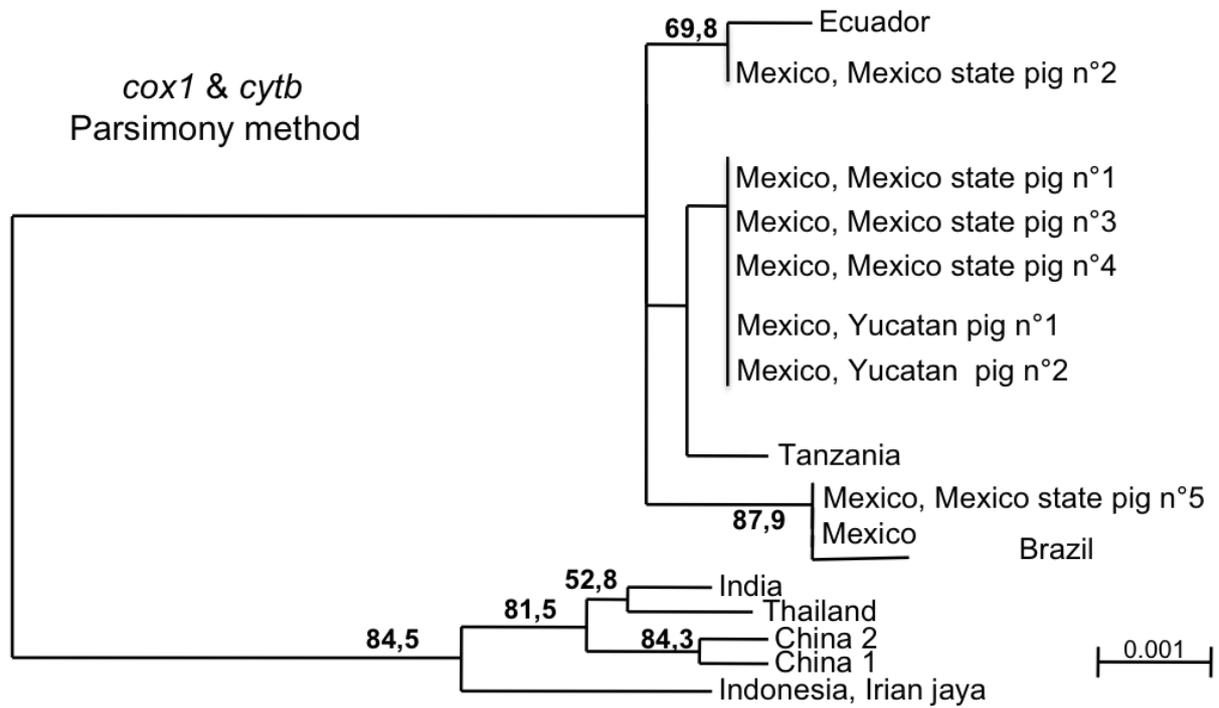
Annexe 3 : Arbres *cox1* (A) et *cytb* (B) avec la méthode de parcimonie de *T. solium* du Cameroun



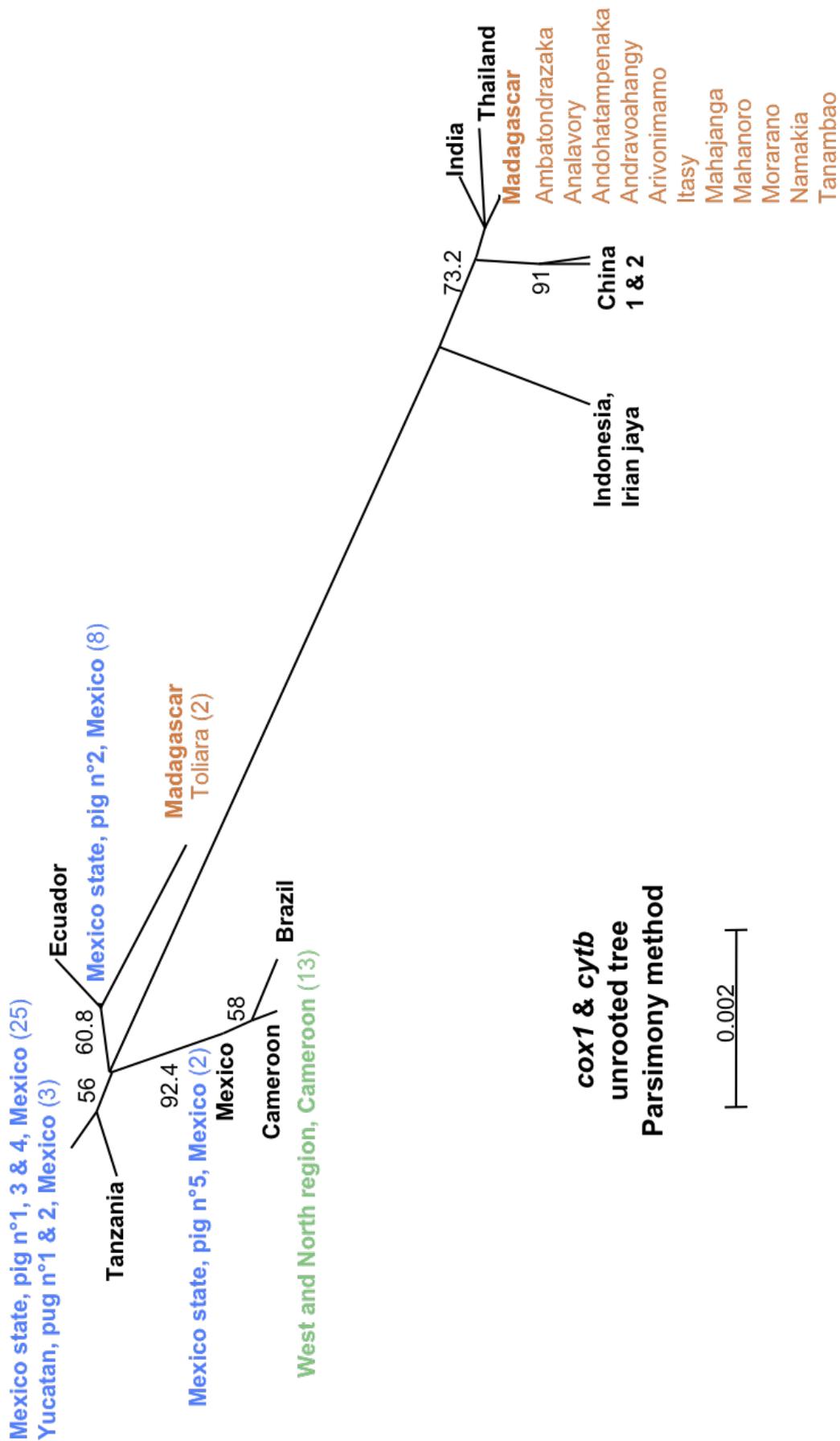
Annexe 4 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de *T. solium* du Cameroun



Annexe 5 : Arbres *cox1* (A) et *cytb* (B) avec la méthode de parcimonie de *T. solium* du Mexique



Annexe 6 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de *T. solium* du Mexique.



Annexe 7 : Arbre non enraciné de parcimonie des séquences de *T. solium* de Madagascar, du Cameroun et du Mexique avec les séquences de référence.

Annexe 8 : Diagnostic de la neurocysticercose. Résultats de l'ELISA-Ag, l'ELISA-Ac, de l'EITB et de la PCR de 121 patients du Mexique classés par groupes et de 20 contrôles.

N°	Groupe	Age (ans)	Sexe	ELISA-Ag	ELISA-Ac	EITB						PCR	
						6-8	12	23-26	39	45	50-55		
1	1a	22	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
2	1a	31	M	POS	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
3	1a	40	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
4	1a	56	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
5	1a	38	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
6	1a	29	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	(-)	POS
7	1a	38	M	NEG	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
8	1b	38	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
9	1b	45	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
10	1b	41	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
11	1b	48	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
12	1b	61	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
13	1b	43	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
14	1b	31	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
15	1b	32	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
16	1b	50	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
17	1b	54	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
18	1b	57	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
19	1b	55	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
20	1b	29	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
21	1b	25	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
22	1b	51	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
23	1b	38	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
24	1b	43	M	POS	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
25	1b	59	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
26	1b	51	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
27	1b	34	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
28	1b	33	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
29	1b	33	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
30	1b	41	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
31	1b	25	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
32	1b	19	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
33	1b	28	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
34	1b	30	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
35	1b	72	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
36	1b	37	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
37	1b	36	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
38	1b	59	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
39	1b	35	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
40	1b	46	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
41	1b	26	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
42	1b	43	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
43	1b	50	F	NEG	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
44	1b	63	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
45	1b	33	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	NEG
46	1b	34	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS

47	1b	37	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
48	1b	50	F	POS	POS	POS	(-)	(-)	+	+	+	+	POS
49	1b	62	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
50	1b	44	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
51	1b	47	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
52	2	51	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
53	2	30	F	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
54	2	46	M	NEG	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
55	2	44	F	NEG	POS	POS	+	(-)	(-)	+	(-)	+	POS
56	2	45	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
57	2	28	F	POS	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
58	3	52	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	(-)	POS
59	3	41	F	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	(-)	POS
60	3	31	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
61	3	67	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
62	3	54	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
63	3	32	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
64	3	30	F	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
65	3	31	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	NEG
66	3	45	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
67	3	47	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
68	3	46	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
69	3	38	F	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	NEG
70	3	27	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
71	3	59	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
72	3	26	M	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
73	3	36	M	NEG	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
74	3	38	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	(-)	(-)	+	POS
75	3	21	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
76	3	39	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
77	3	47	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
78	3	32	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
79	3	39	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
80	3	29	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
81	3	49	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
82	3	24	F	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
83	3	46	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
84	3	28	F	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
85	3	36	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
86	3	57	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
87	3	45	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
88	3	46	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS
89	4	51	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
90	4	44	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
91	4	69	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
92	4	53	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
93	4	31	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
94	4	46	F	POS	POS	POS	+	+	+	+	(-)	+	POS
95	4	35	M	POS	POS	POS	(-)	(-)	+	+	+	+	POS
96	4	65	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS

97	4	51	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
98	4	31	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
99	4	52	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
100	4	52	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
101	4	43	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
102	4	42	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
103	4	28	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
104	4	46	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	(-)	POS
105	4	50	M	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	NEG
106	4	41	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
107	4	33	M	POS	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
108	5	46	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
109	5	59	M	NEG	POS	POS	+	+	+	+	+	+	POS
110	5	42	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
111	5	42	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
112	5	38	F	POS	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
113	5	29	M	POS	POS	POS	+	(-)	+	(-)	(-)	+	POS
114	5	52	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
115	5	23	M	NEG	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
116	5	35	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
117	5	32	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	(-)	+	POS
118	5	57	M	POS	POS	POS	(-)	(-)	+	+	(-)	+	POS
119	5	46	F	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
120	5	31	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
121	5	40	M	NEG	POS	POS	+	(-)	+	+	+	+	POS
122	contrôle	50	F	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
123	contrôle	18	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
124	contrôle	46	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
125	contrôle	26	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
126	contrôle	17	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	POS
127	contrôle	17	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
128	contrôle	26	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG
129	contrôle	30	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
130	contrôle	19	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
131	contrôle	15	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
132	contrôle	36	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
133	contrôle	59	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
134	contrôle	22	M	NEG	NEG	POS	+	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
135	contrôle	39	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
136	contrôle	50	M	NEG	POS	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
137	contrôle	39	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG
138	contrôle	53	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	NEG
139	contrôle	39	M	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
140	contrôle	22	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	+	NEG
141	contrôle	25	F	NEG	NEG	NEG	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	POS

M=masculin ; F=féminin ; POS=positif ; NEG=négatif ; Bandes western blot : +=présence ; (-)=absence ; groupe 1 = vésiculaire (1a = vésiculaire dans le parenchyme, 1b = vésiculaire dans l'ESA ou les ventricules) ; groupe 2 = colloïdal ; groupe 3 = calcifié ; groupe 4 = patients pour lesquels il subsiste un doute quant à la présence de cysticerques vésiculaires ; groupe 5 = patients inclus après traitement.

Annexe 9: Liste des séquences déposées dans EMBL Nucleotide Sequence Database

Michelet,L., Carod,J.F., Rakontondrazaka,M., Ma,L., Gay,F. and Dauga,C

Taenia solium mitochondrial partial cox1 gene : FM958305-FM958317

Taenia solium mitochondrial cytb gene : FM958318-FM958330

Michelet, L., Dauga, C., Moyou, R.

Taenia solium mitochondrial partial cox1 gene : FN995665-FN995666

Taenia solium mitochondrial cytb gene : FN995667-FN995668

Michelet, L., Dauga, C., Sciutto, E., Fragoso, G.

Taenia solium mitochondrial partial cox1 gene : FN995657-FN995660

Taenia solium mitochondrial cytb gene : FN995661-FN995664

Annexe 10 : Liste des communications

2010 Poster lors du congrès annuel de la Société de Biologie Moléculaire et d'Evolution à Lyon, France (4-8 Juillet) : "The pig tapeworm *Taenia solium*, the cause of cysticercosis : Biogeographic (temporal and spatial) origins in Madagascar".

2008 Communication orale lors du "57th Annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene" à la Nouvelle Orléans, USA (7-11 Décembre) : "Combined genotyping and *in silico* comparison studies of pig tapeworm *Taenia solium* match with unique ethnogeography of Madagascar."

Participation au "European Cysticercosis Meeting" à Oeiras, Portugal (11-12 Mars). Présentation des activités de recherche de l'Institut d'Epidémiologie et de Neurologie tropicale de Limoges ainsi que des travaux effectués dans le cadre du doctorat.

2007 Participation au "Cysticercosis Working Group in Eastern and Southern Africa" à Maputo (11-13 Octobre). Présentation orale des travaux de recherche.

Communication orale lors du congrès "First Joint Meeting of the French Society of Parasitology, the German Society of Parasitology and the Swiss Society of Tropical Medicine and Parasitology", Strasbourg (13-16 Juin): "Contribution of the molecular biology to the diagnosis and the phylogeny of cysticercosis."

Annexe 11 : Liste des publications

Willingham AL 3rd, Harrison LJ, Fèvre EM, Parkhouse ME; Cysticercosis Working Group in Europe, 2008. Inaugural meeting of the Cysticercosis Working Group in Europe. *Emerg Inf Dis* 14, e2.

Michelet, L., Carod, J.F., Rakontondrazaka, M., Ma, L., Gay, F., Dauga, C., 2010. The pig tapeworm *Taenia solium*, the cause of cysticercosis: Biogeographic (temporal and spatial) origin in Madagascar. *Mol Phylogenet Evol* 55, 744-750.

Michelet, L., Fleury, A., Sciutto, E., Kendjo, E., Fragoso, G., Paris, L., Bouteille, B. Human neurocysticercosis: Comparison of the performance of different diagnostic test in cerebrospinal fluid in Mexico. (soumis au *Journal of clinical microbiology*)

Michelet, L., Dauga, C. Host influences on the evolution of human tapeworms. (soumis à *Trends in Parasitology*)

Annexe 12: Liste des missions

Janvier - Juin 2006 : Mission à l'Institut Pasteur de Madagascar pour mon stage de M2 Neurosciences et Parasitologie tropicale lors de laquelle les recherches ont été initiées.

26 Mars au 10 Avril 2007 : Seconde mission à l'Institut Pasteur de Madagascar

16 au 23 Janvier 2008 : Mission à Yaoundé, Cameroun lors de laquelle nous avons collecté des cysticerques de porcs dans différents abattoirs avec la collaboration du Pr Roger Moyou.

28 Septembre au 30 Novembre 2008 : Mission à Mexico dans le laboratoire de « Investigaciones biomedicas » de l'UNAM.

Table des figures

Figure 1 : Cycle de <i>Taenia solium</i>	22
Figure 2 : Carte de la répartition mondiale de la cysticercose	22
Figure 3 : Taeniose et Cysticercose ; cycle et interventions	27
Figure 4 : Distribution tissulaire préférentielle des cysticerques de <i>Taenia solium</i>	27
Figure 5: Distribution géographique des sites d'échantillonnage à Madagascar.	44
Figure 6: Distribution géographique des sites d'élevage des porcs au Cameroun	46
Figure 7: Distribution géographique des sites d'élevage des porcs au Mexique.....	46
Figure 8 : Sites polymorphiques des séquences de Madagascar pour le gène <i>cox1</i> (A) et le gène <i>cytb</i> (B) obtenus avec le logiciel Seqout.....	57
Figure 9 : Sites polymorphiques des séquences du Cameroun pour le gène <i>cox1</i> (A) et le gène <i>cytb</i> (B) obtenus avec le logiciel Seqout.....	60
Figure 10: Sites polymorphiques des séquences du Mexique pour le gène <i>cox1</i> obtenus avec le logiciel Seqout.....	62
Figure 11: Sites polymorphiques des séquences du Mexique pour le gène <i>cytb</i> obtenus avec le logiciel Seqout	63
Figure 12 : Arbre <i>cox1</i> du maximum de vraisemblance (A) et des distances (B) de <i>T. solium</i> de Madagascar.....	65
Figure 13 : Arbre <i>cytb</i> du maximum de vraisemblance (A) et des distances (B) de <i>T. solium</i> de Madagascar.....	66
Figure 14 : Arbre du maximum de vraisemblance (A) et des distances (B) pour les deux gènes concaténés de <i>T. solium</i> de Madagascar.	67
Figure 15: Arbres <i>cox1</i> des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de <i>T. solium</i> du Cameroun.....	70
Figure 16: Arbres <i>cytb</i> des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de <i>T. solium</i> du Cameroun.....	71
Figure 17: Arbres des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) pour les 2 gènes concaténés de <i>T. solium</i> du Cameroun	72
Figure 18: Arbres <i>cox1</i> des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de <i>T. solium</i> du Mexique.....	74
Figure 19: Arbres <i>cytb</i> des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de <i>T. solium</i> du Mexique.....	75

Figure 20: Arbres des distances (A) et du maximum de vraisemblance (B) de <i>T. solium</i> du Mexique pour les 2 gènes concaténés	76
Figure 21 : Arbre non enraciné des distances des séquences de <i>T. solium</i> de Madagascar, du Cameroun et du Mexique avec les séquences de référence.....	78
Figure 22 : Arbre non enraciné du maximum de vraisemblance des séquences de <i>T. solium</i> de Madagascar, du Cameroun et du Mexique avec les séquences de référence.	79
Figure 23: Arbre UPGMA <i>cytb</i> indiquant l'estimation des dates de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) en Ma, calculées avec BEAST.....	81
Figure 24: Carte de l'expansion des langues austronésiennes.....	85
Figure 25: Arbre UPGMA <i>cox1</i> indiquant l'estimation des dates de l'ancêtre commun le plus récent (tMRCA) en Ma, calculées avec BEAST.....	88
Figure 26: Distribution géographique en Asie du Sud-Est de différentes espèces de <i>Sus</i>	97
Figure 27 : Schéma des techniques EITB (A) et ELISA sandwich pour la détection d'anticorps (B)	104
Figure 28: Schéma de la technique ELISA double sandwich pour la détection d'antigène	104
Figure 29 : Schéma des étapes du diagnostic de la neurocysticercose.....	107
Figure 30 : Histogramme de la répartition de la population en fonction de l'âge et du sexe	108
Figure 31 : Plaques ELISA avant (A) et après (B) l'ajout de la solution d'arrêt	114
Figure 32 : Comparaison des 2 protocoles de l'EITB.....	116
Figure 33: Photo de bandelettes de Western Blot (EITB) avec le poids moléculaire de différentes bandes (en kDa) obtenues avec le nouveau protocole.....	116
Figure 34 : Photo d'un gel d'agarose après amplification du fragment pTsol9.....	117
Figure 35 : Diagramme par secteur de la répartition des cas de neurocysticercose en fonction du groupe.....	121
Figure 36 : Histogramme de la répartition de la population en fonction du groupe et des différentes catégories d'âge (IQ).....	121
Figure 37 : Histogramme de la répartition de la population en fonction du groupe et de l'inflammation du LCR.....	122

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des échantillons de cysticerques (CC) du Cameroun.....	45
Tableau 2 : Liste des échantillons de cysticerques (CC) du Mexique	47
Tableau 3 : Séquences de amorces pour les gènes <i>cytb</i> et <i>cox1</i>	48
Tableau 4: Liste des séquences (<i>cox1</i> , <i>cytb</i>) avec le pays d'origine et les N° d'accension.	52
Tableau 5 : Comparaison de différents modèles de datation obtenus avec le gène <i>cytb</i> ..	54
Tableau 6 : Date de divergence avec les intervalles de confiance à 95% de 8 sous groupes.	82
Tableau 7: Comparaison des <i>Taenia</i> qui parasitent l'homme.....	87
Tableau 8: Date de l'ancêtre commun le plus récent en million d'années (tMRCA) avec l'intervalle de confiance à 95%.....	89
Tableau 9 : Liste du matériel utilisé pour les tests ELISA.....	110
Tableau 10 : Liste des réactifs utilisés pour les tests ELISA	110
Tableau 11: Caractérisation des échantillons de LCR des patients atteints de neurocysticercose et des contrôles.....	120
Tableau 12: Résultats de l'ELISA-Ac, l'ELISA-Ag, du western-blot (ou EITB) et de la PCR en fonction des différents groupes, en nombre de patients positifs ou négatifs par groupe.....	120
Tableau 13 : Sensibilité et spécificité de chaque technique en fonction des différents groupes et de la localisation avec l'intervalle de confiance à 95%.	124
Tableau 14 : Fréquence (en pourcentage) de présence des différentes bandes (en kDa) dans les EITB positifs pour les différents groupes.....	125
Tabelau 15 : Concordance estimée par le coefficient kappa de Cohen avec l'intervalle de confiance à 95% entre chaque test.	126
Tableau 16 : Fréquence (en pourcentage) de présence des différentes bandes (en kDa) dans les EITB positifs pour les différents groupes en fonction de l'inflammation.	128
Tableau 17 : Détail du suivi de 6 patients et un contrôle.....	129

Table des annexes

Annexe 1 : Arbre <i>cox1</i> (A) et <i>cytb</i> (B) avec la méthode de parcimonie de <i>T. solium</i> de Madagascar	156
Annexe 2 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de <i>T. solium</i> de Madagascar	157
Annexe 3 : Arbres <i>cox1</i> (A) et <i>cytb</i> (B) avec la méthode de parcimonie de <i>T. solium</i> du Cameroun.....	158
Annexe 4 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de <i>T. solium</i> du Cameroun	159
Annexe 5 : Arbres <i>cox1</i> (A) et <i>cytb</i> (B) avec la méthode de parcimonie de <i>T. solium</i> du Mexique.....	160
Annexe 6 : Arbre de parcimonie pour les 2 gènes concaténés de <i>T. solium</i> du Mexique.	161
Annexe 7 : Arbre non enraciné de parcimonie des séquences de <i>T. solium</i> de Madagascar, du Cameroun et du Mexique avec les séquences de référence.....	162
Annexe 8 : Diagnostic de la neurocysticercose.	163
Annexe 9: Liste des séquences déposées dans EMBL Nucleotide Sequence Database... ..	166
Annexe 10 : Liste des communications.....	166
Annexe 11 : Liste des publications	167
Annexe 12: Liste des missions.....	167

Table des matières

Résumé	11
Introduction	14
Etude bibliographique	17
I. L'histoire du <i>Taenia</i>	18
II. La place des <i>Taenia</i> parmi les Taeniidae	19
III. Le cycle.....	20
IV. L'épidémiologie	23
1. A Madagascar.....	25
2. Au Cameroun	25
3. Au Mexique	25
V. Le contrôle et la vaccination.....	26
VI. La taeniose et la cysticerose.....	28
1. La taeniose : clinique, diagnostic et traitement	28
2. La cysticerose humaine : clinique, diagnostic et traitement.....	29
2.1 Biopsie.....	30
2.2 Imagerie	30
2.3 Tests immunologiques.....	31
3. La cysticerose porcine : clinique, diagnostic et traitement	33
3.1 Examen de la langue	33
3.2 Test sérologique	33
3.3 Inspection de la carcasse	34
Objectifs	35
Travail expérimental	37
Partie 1 Phylogénie et évolution de <i>Taenia solium</i>	38
I. Etude de la diversité de <i>T. solium</i> à Madagascar, au Cameroun et au Mexique.....	43
1. Matériels et méthodes	43
1.1 Les échantillons	43
a. A Madagascar	43
b. Au Cameroun	45
c. Au Mexique.....	45

1.2 Les marqueurs mitochondriaux	48
a. La PCR.....	48
b. Le séquençage.....	49
1.3 L'analyse phylogénétique	50
a. L'analyse et l'alignement des séquences.....	50
b. La sélection du modèle de substitution.....	51
c. La construction des arbres phylogénétiques	51
1.4 L'estimation des dates de divergence	53
2. Résultats	56
2.1 Le polymorphisme des séquences de <i>T. solium</i>	56
a. A Madagascar	56
b. Au Cameroun	59
c. Au Mexique.....	61
2.2 La phylogéographie.....	64
a. A Madagascar	64
b. Au Cameroun	68
c. Au Mexique.....	73
d. L'analyse combinée des séquences de <i>T. solium</i>	77
2.3 L'origine biogéographique de <i>T. solium</i>	80
3. Discussion	83
II. Histoire évolutive de l'association hôte-parasite.....	86
1. La divergence des <i>Taenia</i> qui parasitent l'homme.....	86
2. Le changement d'hôte définitif et l'émergence de <i>Taenia</i> chez l'homme.....	90
3. L'homme moderne et le développement de l'agriculture	94
4. L'influence récente des hôtes sur l'évolution des <i>Taenia</i>	96
4.1 Situation de <i>Taenia saginata</i>	96
4.2 <i>Taenia asiatica</i> en Asie du Sud-Est.....	97
4.3 La biogéographie de <i>Taenia solium</i>	98
III. Conclusion	101
Partie 2 Diagnostic de la neurocysticercose.....	102
I. Introduction.....	103
1. Diagnostic biologique de la cysticercose humaine.....	103
1.1 Immuno-diagnostic	103

a. Détection d'anticorps.....	103
b. Détection d'antigène.....	105
1.2 Biologie moléculaire.....	106
2. Problématique.....	107
II. Matériels et méthodes.....	108
1. Population.....	108
2. Définitions des cas.....	109
3. Suivi des patients.....	109
4. Matériel pour les techniques ELISA.....	110
5. ELISA détection d'anticorps.....	111
5.1 Préparation de l'antigène.....	111
5.2 Préparation des tampons.....	111
5.3 Protocole.....	112
5.4 Interprétation.....	112
6. ELISA détection d'antigène.....	113
6.1 Préparation des tampons.....	113
6.2 Protocole.....	114
6.3 Interprétation.....	114
7. EITB ou Western Blot.....	115
7.1 Protocole.....	115
7.2 Interprétation.....	115
8. PCR.....	117
9. Analyse statistique.....	118
10. Considérations éthiques.....	118
III. Résultats.....	119
1. Description de la population.....	119
2. Sensibilité et spécificité.....	123
3. Concordance.....	125
4. Inflammation du LCR et sensibilité des différentes techniques.....	127
5. Evolution des tests au cours du suivi des patients.....	129
IV. Discussion.....	130
V. Conclusion.....	133
Conclusion et Perspectives.....	134

Références bibliographiques.....	138
Annexes.....	155
Table des figures.....	168
Table des tableaux	170
Table des annexes	171
Table des matières.....	172