



**Ambassade de France**  
 MAE / SCAC  
**Projet FSP PARRUR**  
 Bureaux à Ankatso  
 Université d'Antananarivo

**Projet PARRUR-3**

**Domaine 2- Promotion de l'innovation technologique dans le secteur rural.**  
**Santé animale / Services vétérinaires**  
**Axe 2- Recherche-Interaction recherche/formation**

**Titre : Amélioration de la qualité de la viande porcine par le contrôle de la cysticerose au niveau des élevages et des marchés : recherche et formation**

**Institutions partenaires du projet**

Institut Pasteur de Madagascar (coordonateur)  
 Direction de la recherche zoothénique et vétérinaire  
 CIRAD – La Réunion  
 Direction des Services Vétérinaires, Madagascar  
 Faculté de médecine / Département des sciences et Médecine Vétérinaires  
 Associations villageoises  
 Institut Pasteur Paris  
 Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

**Liste des participants**

Nom, Prénom	Unité / Institution	Qualification	Temps projet
<b>Coordinateur scientifique</b>			
A. Rahantamalala	Institut Pasteur Madagascar	PhD	100%
Ronan Jambou	Immunologie / IP Madagascar	MD, PhD	20%
P Nativel	Institut Pasteur Madagascar	Ing biotechno	100%
M Rakotondraza	Institut Pasteur Madagascar	techn sup	50%
N Randrianasolo	Institut Pasteur Madagascar	techn	50%
P Ramandanirainy	Institut Pasteur Madagascar	thèse sciences	100%
S Ramiandrisoa	Institut Pasteur Madagascar	thèse vétérinaire	100%
H Rasamoelina	Fac. Med. DESMV / DRZV	Vet, PhD	20%
E Razafimanantsoa	Fac. Med. DESMV	Ing. PhD	20%
M Ravakarivelo	Fac. Med. DESMV / DRZV	Vet, MSc, PhD candidate	10%
4 étudiants	Fac Sciences / Fac Med-DESMV	thèse vétérinaire / DEA	100%
V Porphyre	CIRAD La Réunion	Vet	20%

J Bellalou	PFPR / IP Paris	PhD	5%
J Chamot-Rooke	PF3 / IP Paris	PhD	5%
Un ingénieur	PF3 / IP Paris	PhD	5%
P Boireau	ANSES Maison Alfort	Vet PhD	5%

## Contacts :

Anjanirina Rahantamalala et Ronan Jambou  
Unité d'immunologie , Institut Pasteur de Madagascar  
Email : [anjanirina@pasteur.mg](mailto:anjanirina@pasteur.mg); [rjambou@pasteur.mg](mailto:rjambou@pasteur.mg)

**Durée :** 10 mois

## Résumé

**Justification, enjeux, état de l'art et objectifs :** L'homme est le seul hôte définitif connu du ver solitaire (*Taenia solium*) qui provoque le téniasis humain. Le cochon constitue l'hôte intermédiaire par ingestion d'œufs à partir des excréments humains, ces derniers se développent en cysticerque et causent la cysticercose porcine le plus souvent asymptomatique. La cysticercose survient chez l'homme par «péril fécal» mais la contamination de la viande est le principal facteur de propagation des parasites. A Madagascar, la cysticercose porcine est de plus la première cause de saisie de viande avec près de 20% de cochons infectés dans les petites tueries villageoises. Elle est ainsi responsable d'une perte financière importante et constitue un facteur de propagation de la cysticercose humaine. Devant la perte financière occasionnée les éleveurs sont motivés pour un contrôle de la cysticercose dans leur élevage. L'élevage familial domine (70%) avec un système d'hygiène et sanitaire rudimentaire (Ministère de l'élevage, 2011). Les bonnes pratiques d'élevage auront un impact majeur. Mais le contrôle des cochons avant abattage est indispensable à l'amélioration et la valorisation de la filière porcine. C'est une priorité des ministères pour la santé publique mais aussi pour augmenter le revenu des ménages. Cependant avant abattage, seule la palpation de la langue est utilisée malgré sa faible sensibilité.

### Méthodologie et plan de travail:

Le dépistage de la cysticercose porcine chez les animaux vivants nécessite la mise au point d'un test de diagnostic rapide (TDR) utilisable sur le terrain. Une sélection bio-guidée d'antigènes suivi du clonage des gènes correspondants a été entreprise et sera poursuivi pour ce projet. Deux types d'antigènes seront utilisés pour le clonage : 1/ la fraction glycosylée membranaire utilisée pour le western blot de référence (CS50), 2/ les protéines du liquide des cysticerques (LC). Un fractionnement biochimique des protéines du LC a été réalisé associé à une sélection bioguidée des fractions d'intérêt. Les protéines seront identifiées par spectroscopie de masse et les gènes correspondants seront clonés pour produire des protéines recombinantes. La spécificité et la sensibilité de l'ensemble des antigènes recombinants ainsi produits seront évaluées avec 1000 sérums de cochons par ELISA. Un test TDR sera développé et sera évalué sur terrain avec 1000 autres sérums de cochons issus d'une soixantaine d'éleveurs. Parallèlement des études de terrain seront réalisées pour définir les paramètres clés de la filière porcine notamment dans une zone pilote de Moramanga permettant la mise en place d'une stratégie de tests des animaux sur pieds. Des formation/sensibilisation des villageois sera faite au sein d'une zone pilote pour préparer la mise en œuvre de cette stratégie. Enfin l'expertise développée sera valorisée sous forme académique, en proposant l'organisation d'un parcours spécialisé sur la filière porcine au sein des masters MESVT en cours de finalisation.

**Résultats, valorisation attendus et impact souhaité:** Le test de diagnostic rapide de la cysticercose porcine développé pourra être breveté et les différents résultats de ce projet (comme l'identification des protéines etc...) pourront être également valorisés sous forme de publications scientifiques (poster, articles etc...). Un guide de bonne pratique d'élevage sera finalisé pour préparer la phase de mise en place de la stratégie globale de contrôle de la cysticercose porcine sur une zone pilote.

**Mots-clés :** Madagascar, *Taenia solium*, cysticercose, sécurisation alimentaire, test de diagnostic rapide

## Coordonnateur scientifique du projet:

Nom : RAHANTAMALALA

Prénom : Anjanirina

Statut : Chercheur

Adresse : Unité d'Immunologie – Institut Pasteur de Madagascar – BP 1274 Antananarivo 101

E-mail : [ranjanirina@pasteur.mg](mailto:ranjanirina@pasteur.mg)

Téléphone professionnel: 0 20 22 401 64/65 poste 530

## Etat de l'art et originalité du sujet

### Quel diagnostic pour la cysticercose porcine

Les activités de recherches en pathologie porcine à Madagascar ont été consacrées essentiellement à la mise au point des vaccins contre la maladie de Teschen (MT) et la peste porcine classique (PPC) ainsi qu'à leur amélioration. (Ministère de l'Agriculture, de l'Elevage, et de la Pêche, 2004). Aucune étude n'a été faite sur le développement des TDR pour la détection de la cysticercose porcine. Dans la littérature, près d'une centaine de publications citent des méthodes sérologiques et/ou des études de séro-épidémiologie de la cysticercose. Trois approches sont les plus utilisées l'ELISA, le western blot (Furrows, 2006 ; Yera, 2003 ; Gekeler, 2002) et la recherche d'antigènes circulants. Ces techniques qui nécessitent toutes d'être réalisées en laboratoire ne sont pas directement utilisables sur terrain dans les milieux ruraux, contrairement aux bandelettes TDR facile à réaliser par les éleveurs eux-mêmes sans recours aux médecins vétérinaires. Le western blot reste la technique de référence (Tsang et al., 1989, Lee et al., 2005) surtout utilisé chez l'homme. Ces approches utilisent essentiellement des antigènes natifs extraits du parasite *Taenia solium* dont la disponibilité et la production en quantité suffisante limitent ces techniques. Ces limitations et la lourdeur de la technique n'ont pas permis sa large diffusion et aucune stratégie de surveillance biologique des troupeaux n'est disponible sur le terrain. Actuellement, aucun test de diagnostic rapide (TDR) n'existe encore. Notre projet est donc de développer un test de diagnostic rapide de la cysticercose porcine utilisable sur le lieu même de stabulation des troupeaux pour permettre la mise en place d'une politique de qualité de cette filière.

Dans le monde, quelques kits de diagnostic sont déjà commercialisés. Ils utilisent des extraits protéiques de cysticerques plus ou moins purifiés. Aucun test utilisant des antigènes recombinants n'est commercialisé. En France, le QUALICODE CYSTICERCOSE IGG\*REF DK-C264-024 (ELISA), BIONOBIS est enregistré pour le diagnostic. Aux USA une licence a été demandée pour la protéine membranaire T24 pour l'utilisation en ELISA et immunoblot (Provisional Application No. 60/471, 950, 2003). Cependant aucun antigène ne s'est imposé comme référence, le Qualicode donnant par exemple de nombreux résultats positifs difficiles d'interprétation lors des études épidémiologiques. Les antigènes disponibles et identifiés à l'heure actuelle sont principalement des antigènes membranaires des cysticerques, les techniques utilisant ces antigènes ne permettent pas de distinguer les infestations actives des infestations anciennes (cysticerques calcifiés) ou d'une exposition transitoire au parasite (Garcia et al., 2001).

### Un test rapide pour la cysticercose porcine

Parallèlement à l'étude des antigènes déjà décrite pour le western blot (Revue Deckers et al., 2008 ; Krecek et al., 2008), nous proposons de nous intéresser à d'autres antigènes contenus dans le liquide des vésicules de cysticerques. Nos études chez l'homme montrent que ces antigènes sont plus spécifiques de la phase active de la cysticercose. Cette approche est donc originale et permettra le dépôt de brevet. Nous utiliserons une stratégie de sélection des protéines d'intérêt diagnostique basée sur le fractionnement biochimique des extraits bruts obtenus des parasites eux même, suivi d'un criblage bio-guidé utilisant des sérums de porcs ladres obtenus en abattoir. Une fois les meilleures protéines sélectionnées, les gènes correspondant seront clonés et les protéines recombinantes correspondantes seront produites (Phase 1). Cette stratégie de développement d'outils diagnostique était pour le moment limitée par la lourdeur de l'identification des antigènes parasitaires d'intérêt. Mais le projet de séquençage du génome de *Taenia solium* (120 ~ 270 Mb) a commencé en 2006 au Mexique et conduit par Juan

Pedro Laclette avec qui nous collaborons permet une avancée significative dans le domaine. La spécificité de ce projet réside dans le fait que i) les éleveurs et les adjoints vétérinaires des villages seront les utilisateurs principaux de ces tests, ii) et que ces antigènes recombinants pourront être ultérieurement évalués pour le diagnostic de la cysticercose humaine.

## **Justification, enjeux et problématique scientifique**

### **Un problème économique et de santé publique**

A Madagascar, la filière porcine est positionnée au deuxième rang en valeur et au troisième rang en nombre par rapport aux autres types d'élevage bovin, ovin etc .... Les principales régions productrices sont le centre, les parties centrale-Ouest, Ouest et Est de l'île qui représentent environ 87% de l'effectif national (Ministère de l'élevage, 2011). 70% du sous-secteur et comptant en moyenne 1 à 10 têtes par éleveur sont destinés en majorité pour l'engraissement (Ministère de l'Agriculture, de l'Élevage, et de la Pêche, 2004). L'élevage de porc est soit la base du revenu familial soit une activité secondaire pour équilibrer les revenus des ménages.

La cysticercose est due au développement chez l'homme et chez le porc des larves de *Taenia solium* appelées *Cysticercus cellulosae*. Le cycle de *Taenia solium* commence chez l'homme qui est le seul hôte définitif connu du ver solitaire et provoque le téniasis humain. Le cochon qui en est le principal réservoir constitue l'hôte intermédiaire par ingestion d'œufs à partir des excréments humains, ces derniers se développent en cysticerques et causant la cysticercose porcine. La cysticercose survient chez l'homme dans un contexte de «péril fécal». La neurocysticercose est la forme la plus grave de la cysticercose humaine qui touche le système nerveux central et la plus fréquente cause de l'épilepsie avec 50 000 décès par an dans le monde. Plus de 80% des 50 millions de personnes au monde qui sont touchées par l'épilepsie vivent dans les pays en voie de développement (Source : OMS, 2010). A Madagascar la cysticercose concerne 15% de la population. Le coût total de la cysticercose à Madagascar dépasse les 1000 milliards d'Ariary (360 millions d'euros) dont 96% est due à l'impact sur la santé publique (Andriamparany, 2012).

Il existe 2 types de systèmes d'élevages : l'élevage en divagation et l'élevage fermé. La divagation des porcs couplée au péril fécal humain sont connus pour être les facteurs de risque les plus importants de la persistance de la téniasis humaine et de la cysticercose porcine et humaine. Mais même les élevages fermés de porcs sont aussi exposés à plusieurs facteurs de risque (déchets de cuisine, fourrage, déplacement des porcs hors élevage, introduction d'animaux contaminés,...) (Andriamanana, 2013). Par ailleurs, la filière de commercialisation des porcs comporte plusieurs points qui favorisent la persistance et la diffusion de la maladie : les marchés de porcs vivants, les abattages clandestins (familiaux ou commerciaux), ... La législation actuelle interdit la divagation, les marchés de porcs vivants et les abattages clandestins. Mais les contextes socio-économiques des élevages et des différents acteurs de la chaîne de valeur rendent ces textes théoriques et non applicables ; à l'exemple des marchés de porcs vivants qui sont au cœur du système d'échange et de vente d'animaux en milieu rural, de l'absence même d'abattoirs ou d'inspecteurs de viande dans beaucoup de localités, du manque de trésorerie et donc de la valorisation des ressources alimentaires naturelles via le système de divagation. Pourtant dans cette filière porcine, la cysticercose est responsable d'une perte financière importante qui décourage les petits éleveurs. En effet, c'est la première cause de saisie de viande qui peut atteindre environ 17% de cochons infectés dans les petites tueries villageoises (sans tenir compte des abattages clandestins). Elle a été identifiée comme le problème prioritaire par les éleveurs traditionnels, devant les autres maladies telles que les pestes porcines (Rasamoelina-Andriamanivo, 2006). Ceci est principalement due aux pertes économiques qu'elle engendre puisque le prix des porcs ladres sont réduits d'au moins la moitié lors de transactions avec les collecteurs ou les bouchers. Parallèlement à cela, du fait de la prévalence importante de la cysticercose humaine, beaucoup de consommateurs des grandes villes s'abstiennent de consommer du porc et constituent ainsi une perte d'opportunité de marché pour la filière. Les grandes et moyennes distributions contactées sont conscientes de ce problème et seraient prêtes à donner un plus valu à une viande reconnue indemne de cysticercose. Certaines grandes entreprises installées à Madagascar et ayant un personnel important en nombre (nationaux et expatriés), sont demandeurs de viande de qualité mais sont freinées par l'existence de cette maladie. Ils se tournent alors vers l'importation de viande.

Un autre problème de la cysticerose est l'insuffisance des outils de diagnostic et de dépistage chez les animaux. En termes de diagnostic ante-mortem, la palpation de la langue reste la méthode la plus couramment utilisée mais elle ne permet que la détection des fortes charges parasitaires. Ce test est utilisé en routine lors des enquêtes épidémiologiques mais la sensibilité reste faible (inférieure à 20%). A l'abattoir, le diagnostic post-mortem repose sur l'examen des carcasses des porcs. Ce diagnostic est rétrospectif et ne permet pas une sélection des élevages pour l'exportation. A Madagascar, la cysticerose porcine est la première cause de saisie qui peut atteindre environ 17% de cochons dans les petites tueries villageoises (sans tenir compte des abattages clandestins). Elle est ainsi responsable d'une perte financière importante. L'élevage familial qui favorise la cohabitation du porc et de l'homme constitue un facteur de propagation de la cysticerose chez le porc. Une infestation importante de l'homme par le *Taenia* favorise à l'inverse la cysticerose humaine. En effet l'homme peut remplacer le porc dans le cycle du parasite *Taenia solium* responsable de la cysticerose et peut développer des formes larvaires, les cysticerques. La neurocysticerose est la forme la plus grave de la cysticerose humaine qui touche le système nerveux central. C'est la cause la plus fréquente de l'épilepsie avec 50 000 décès par an dans le monde. Plus de 80% des 50 millions de personnes au monde qui sont touchées par l'épilepsie vivent dans les pays en voie de développement (Source : OMS, 2010).

Le dépistage de la cysticerose dans les élevages, avant abattage reste donc un enjeu important pour la promotion de la filière chez les petits agriculteurs en même temps que pour le contrôle de la maladie humaine. Les enjeux liés au contrôle du réservoir animal de la cysticerose sont donc à la fois : de santé publique, de socio-économie avec la promotion d'une filière intégrant aussi bien de petits élevages familiaux que des élevages commerciaux, mais aussi et surtout scientifique.

## Objectifs scientifiques

### Objectif principal

Améliorer la qualité de la viande porcine par un contrôle biologique des troupeaux directement en zone rurale, en développant un test de diagnostic rapide (TDR) et en proposant une approche villageoise de ce contrôle.

### Objectifs spécifiques

- Identifier et produire des protéines recombinantes correspondant aux antigènes de la CS50 et du liquide des vésicules de cysticerque (L.C.) de *Taenia solium*,
- Evaluer l'intérêt diagnostique de ces protéines recombinantes par la méthode d'ELISA en comparaison avec le Western Blot de référence en utilisant une banque des sérums de porcs obtenus en abattoir
- Développer des bandelettes d'immunochromatographie avec les recombinants sélectionnés, et évaluer leurs performances diagnostiques pour le dépistage des porcs ladres dans les abattoirs, et dans les élevages porcins de la région d'Antananarivo
- Tester la mise en place de la stratégie de dépistage de la cysticerose directement en zone rurale

### Objectifs de valorisation

- Développer un test immunochromatographique pour le diagnostic de la cysticerose porcine
- Développer des tests ELISA pour le diagnostic de la cysticerose porcine au laboratoire
- Développer des enseignements théoriques et pratiques sur les éléments d'amélioration de la filière porcine (démarche de filière, diagnostic biologique, démarche qualité, pathologie) dans le cadre de la mise en place du LMD

### Ouverture à d'autres projets

La stratégie proposée permettra d'aborder d'autres questions en parallèle:

- (i) Etude de phylogénétique de *T. solium* par l'étude du polymorphisme moléculaires des protéines cibles sélectionnées ( par comparaison des séquences des gènes correspondants de

cysticerques récoltés dans 10 points de Madagascar mais aussi en Côte d'Ivoire, au Cameroun, au Cambodge, au Mexique et au Pérou).

- (ii) Analyse de l'épidémiologie et les facteurs de risque de la maladie (aucune donnée fiable n'existe encore à Madagascar pour les élevages)
- (iii) Analyse socio-économique de la filière porcine et identification des leviers d'amélioration de la qualité et du rendement (Identification des points critiques à surveiller et à corriger dans le cadre d'une filière qualité)

## Méthodologies

### Work package 1 : mise au point d'un test de dépistage pour les zones rurales

- **Phase 1 : Identification des protéines d'intérêt pour la mise au point d'un test rapide**

Cette phase de travail est en cours depuis 2011.

La méthode de référence est le western blot utilisant une fraction glycosylée de protéines de membrane de cysticerque. Six protéines sont considérées comme pathognomoniques de la cysticerose. Les gènes correspondant sont connus. La première étape est de cloner et exprimer ces protéines. Quatre protéines ont été clonées à Madagascar. Leur production est en cours. Parallèlement le liquide de kyste semble très immunogène chez le porc. L'analyse des réponses sérologiques contre ces protéines a été menée dans le laboratoire par western blot avec un panel de sérums de porcs présentant des cysticerques sur la carcasse à l'abatage et des sérums de porcs négatifs provenant d'élevages industriels à Madagascar et à la Réunion. Les protéines du liquide sont ensuite séparées selon leur charge par chromatographie échangeuse d'anions ou AIEX et les fractions d'éluion sont analysées à nouveau par western blot avec les sérums de porcs ladres. Les bandes d'intérêt en western blot sont séparées à nouveau par électrophorèse bidimensionnelle et les spots d'intérêt sont identifiés à nouveau par western blot. Ces spots d'intérêt sont identifiés par Spectrométrie MS-MS à la PF3 grâce à une banque d'ESTs de *T. solium* (le génome complet sera disponible d'ici quelques semaines). Au total quinze fractions protéiques éluées à différentes concentrations en NaCl ont été obtenues. Après criblage avec les sérums de porcs ladres, quatre fractions ont montré des bandes d'antigénicité intéressante. Certains spots sont déjà à la PF3 (IPP) pour identification.

- **Phase 2 : Production d'antigènes recombinants et leur validation**

Cette phase de travail est en cours depuis 2012. Les quatre gènes codant pour les antigènes membranaires des cysticerques correspondants aux bandes spécifiques du western blot de référence sont déjà clonés chez *Escherichia coli*. Les gènes correspondant aux protéines d'intérêt dans le liquide des kystes (cf. Phase 1) seront clonés dans un plasmide bactérien et exprimé chez *Escherichia coli*. La glycosylation étant une modification importante de ces protéines pour leur antigénicité l'utilisation du système *L. tarentolae* est envisagée. Des tests préliminaires seront faits à la PFPR avant transfert de la technologie à l'IPM.

Pour chaque protéine recombinante un test ELISA sera mis au point. L'évaluation de la sensibilité et spécificité des ELISA sera réalisée pour le diagnostic de la cysticerose en comparaison avec la méthode de référence (Tsang *et al.*, 1989, Lee *et al.*, 2005). Chaque protéine sera évaluée séparément puis les performances des tests multiples seront évaluées. 1000 sérums de cochons (diagnostiqués présentant ou non de cysticerques en abattoir) seront testés.

L'étude des réactions croisées sera réalisée grâce à la sérothèque de l'ANSES-Maison Alfort.

- **Phase 3 : Développement de nouveaux tests TDR utilisant les antigènes recombinants**

Un test rapide de détection d'anticorps contre la cysticerose porcine sera développé en utilisant les antigènes recombinants sélectionnés à la phase précédente. La technologie est déjà en place à l'IPM qui assure la production de TDR pour la détection de l'antigène F1 de *Yersinia pestis* ou des anticorps dirigés contre cet antigène. Un lot de 2000 bandelettes sera réalisé pour leur évaluation i) au laboratoire avec le panel de sérums disponibles, ii) sur le terrain (dans les élevages peri-urbains d'Antananarivo). Le western blot sera la méthode de référence pour la validation des tests. L'examen des carcasses pour les bêtes prélevées en abattoir permettra également une évaluation de la valeur prédictive positive et négative des ICT.

- **Phase 4 : validation des ICT comme test diagnostique**

-Phase 4a: Validation de la bandelette dans différentes conditions de mesure (température, humidité..), conditions de recueil du sérum (quantités), analyse de la reproductibilité du test.

-Phase 4b : Etude rétrospective à partir des sérums déjà identifiés par la méthode de référence  
Analyse des performances du test à partir d'une étude cas/contrôle (les cas positifs sont définis par un western blott positif et les cas négatifs par un western blott négatif. Les 2 tests sont réalisés sur chaque sérum à l'aveugle.

-Phase 4c : Etude prospective à partir des sérums consécutifs d'une série de porcs chez qui la question du diagnostic se pose.

Evaluation des bandelettes en situation de terrain sur "sites ". Pour tous les porcs chez qui la question d'une contamination par cysticerose se pose, le test de la bandelette sera systématiquement réalisé parallèlement à la technique de référence (western blott). Les 2 tests seront réalisés à l'aveugle.

Mille tests seront réalisés. Pour une prévalence attendue de 20% de western blot positifs la précision sera de 3% pour une sensibilité de 0.95

- **Phase 5 Analyses des résultats et production des documents réglementaires**

L'analyse des données sera conduite par Muriel Vray (IPP) pour les performances ainsi que les tests statistiques (sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positives, valeurs prédictives négatives, LR+, LR-).

## **Workpackage 2 Formalisation d'une stratégie de contrôle de la cysticerose à Madagascar**

La stratégie globale et les problèmes à résoudre ont été décrits dans un article soumis à publication. Le but de ce volet est i) de recueillir les éléments nécessaires à la finalisation d'un guide de bonne pratique de l'élevage de porc adapté au monde villageois , ii) d'analyser les éléments clés de la filière porcine dans la zone de Moramanga pour ii) préparer une zone pilote d'intervention pour la lutte contre la cysticerose. Comme cela a été décrit dans les enjeux, devant l'état de défaillance du système de contrôle supposé éliminer les cochons contaminés de la filière, l'autofinancement du dépistage par les villageois eux même motivés par une amélioration des conditions de vente de leur cochons, est l'élément fondamental de la pérennisation de la lutte. Le fonctionnement local de la filière « viande de porc » sera analysé lors des enquêtes et des approches participatives, afin d'en connaître la force et la vulnérabilité des éleveurs en cas d'infestation des porcs.

Les produits de ces différentes études permettront d'adapter les messages et guide de bonne pratique au contexte local des élevages pour la formation des villageois.

La formation des villageois se fera par une approche participative et sera divisée en plusieurs étapes :

- Information sur les maladies et leurs impacts sur le plan économiques et sanitaires.
- Analyse commune et participative des forces et faiblesses des pratiques actuelles et du contexte des élevages bovins et porcins.
- Présentation et discussion sur les stratégies à adopter. L'objectif est de réduire l'exposition aux facteurs de risque et de renforcer les stratégies de valorisation des produits. Des propositions techniques (conduite d'élevage, alimentation,...) ayant intégré la perception des éleveurs, le contexte économique local assorties d'analyses coût/bénéfice et/ou de budget partiel serviront de bases à ces discussions. Pour les éleveurs de cochons, le guide de bonne pratique sera présenté et servira de support en plus des autres éléments identifiés par les enquêtes.
- Elaboration commune d'une feuille de route de réalisation des stratégies pour les éleveurs volontaires. Cela implique la mise en place d'indicateurs de suivi afin d'en évaluer l'évolution.

## **Workpackage 3 Valorisation des acquis sous forme d'enseignement à l'école vétérinaire**

L'objectif est de développer des enseignements théoriques et pratiques sur les éléments d'amélioration de la filière porcine (démarche de filière, diagnostic biologique, démarche qualité, pathologie) dans le cadre de la mise en place du LMD à la faculté de Médecine. Les enseignements divers existant actuellement au cours des différentes années de formation sont : cours de pathologie porcine (5eme année 28h) ; cours de sécurité sanitaire des denrées animales ; cours sur les zoonoses ; cours sur l'alimentation porcine ; cours sur l'élevage porcine ; cours sur les aspects socio-economiques de

la santé animale ; travaux pratiques sur les animaux de rente (5eme) ; stage spécifique sur le porc (6eme)/

Nous proposons une restructuration des enseignements sous forme d'un parcours spécialisé de master sur l'élevage porcin. Grâce aux acquis du projet et aux compétences regroupées au sein de l'équipe du projet, nous interviendrons dans cette nouvelle filière d'enseignement pour renforcer les aspects de diagnostic, d'immunologie, de parasitologie, d'utilisation des nouvelles technologies, de démarche qualité, de surveillance des zoonoses. Des travaux pratiques seront organisés par l'équipe du projet car cet aspect est manquant au niveau du Département.

Parallèlement à la définition du parcours master pour la rentrée 2014, des travaux pratiques pourront dès cette année être organisés en 5<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> année. Un transfert de technologie sera effectué progressivement pour que les activités puissent être localisées au DESMV. Ces aspects pratiques comprendront :

- Stages d'analyse de la filière en condition pratique (élevage, abattoir, marchés)
- TP sur la cysticose porcine (microscopie, immunologie, TDR)
- Pratique et conception d'immunodiagnostic (en général)
- Pratique et conception de diagnostics moléculaires des zoonoses

Des stages étudiants seront envisagés au sein même du projet et feront l'objet de travaux spécifiques de recherche

## Résultats et produits attendus, impacts dans la formation supérieure

### Bénéficiaires

Acteurs de la filière porcine : éleveurs, collecteurs  
Paysans (amélioration du revenu et du niveau de vie de la famille, sécurisation alimentaire)  
Consommateurs de viande de porc  
Etudiants vétérinaires

### Valorisation en biotechnologie

- ✓ Obtention de nouvelles protéines recombinantes d'intérêt diagnostic cinq protéines classiques (CS50) et 4 nouvelles protéines identifiées dans le LC produites chez la bactérie *E. coli* et/ou chez *L. tarentolae*
- ✓ Test ELISA mis au point avec ces protéines correspondantes
- ✓ Un TDR développé avec les meilleures protéines sélectionnées pour le diagnostic (un lot de 2000 bandelettes TDR produit pour l'évaluation épidémiologique en élevage)

### Valorisation pour la filière porcine

- ✓ Formation des éleveurs sur la cysticerose et diminution du réservoir

La mise en évidence de la maladie chez les cochons permettra de convaincre les éleveurs de la nécessité des bonnes pratiques d'élevage. Un guide a été rédigé lors d'études précédentes et sera mis en œuvre pour la première fois lors de ce projet. L'amélioration sanitaire des viandes permet de réduire la transmission des parasites à l'homme.

- ✓ Promotion du petit élevage familiale par l'amélioration de la qualité sanitaire

La valorisation de la production porcine familiale entraîne une augmentation de revenus des familles et une meilleure nutrition des populations locales. L'amélioration des mesures de biosécurité et d'alimentation des porcs diminue le risque de maladies animales, notamment de la cysticerose et renforce les résultats technico-économiques des petits élevages. L'éducation/formation, la sensibilisation et l'organisation des petits éleveurs sont les clés pour l'amélioration sanitaire des élevages. La qualification des élevages et le suivi vétérinaire permettra le renforcement du pouvoir de négociation des éleveurs par rapport aux collecteurs et bouchers qui ont l'habitude d'acheter les animaux au tiers de leur prix quand ceux-ci sont touchés par les maladies.

### Valorisation scientifique et académique

- ✓ Reformulation globale de l'enseignement sur la filière porcine sous forme d'un parcours spécialisé de master au sein du master de sciences et médecine vétérinaires déjà en cours de formulation. Le parcours proposé s'inscrira dans la maquette prochainement soumise au ministère
  - ✓ Renforcement des enseignements pratiques (TP etc) dès l'année universitaire en cours
  - ✓ Introduction des nouvelles technologies dans la démarche qualité en Médecine vétérinaire
- renforcement des connaissances et compétences en biotechnologie (biologie moléculaire/génie génétique, bioinformatique, méthode de sélection animale etc)
- ✓ deux mémoires de DEA réalisés (Faculté des Sciences d'Antananarivo)
  - ✓ deux mémoires de thèse vétérinaire soutenus (Faculté de Médecine Vétérinaire d'Antananarivo)
  - ✓ Ecriture d'au moins trois articles dans des revues internationales
- ✓ Développement d'une expertise malgache sur la mise au point, la validation et l'évaluation d'outils de diagnostic et de dépistage

### **Valorisation industrielle**

- ✓ Demande de brevet

Une Lettre de déclaration d'invention sera déposée pour les antigènes d'intérêt diagnostique, les tests ELISA mis au point et le TDR développé. Après validation épidémiologiques (Phase 3) une demande de brevet sera faite pour le meilleur antigène sélectionné.

- ✓ Transfert à l'industrie

Ce transfert est prévu, y compris dans le cadre d'une start-up réunionnaise. Il n'y a pas de kit utilisant des recombinants pour les porcs et aucun test rapide sur le marché. Dans le cadre d'une démarche qualité volontaire des éleveurs (soutenu par la grande distribution) pour améliorer la qualité de la viande le marché des TDR cysticerose se chiffre en millions de tests. Ce test aidera au contrôle de la cysticerose humaine à Madagascar et dans d'autres pays du Sud.

## **Procédures pour la création de la plateforme**

### **Réunions, partage de l'information**

Le projet sera piloté par un comité qui assurera le suivi parallèle des activités de laboratoire et de terrain. Ce comité inclura les chercheurs responsables des différentes activités. Il définira le flow-chart des actions à mener. Un comité parallèle sera formé pour la définition des contenus pédagogiques et des travaux pratiques à mettre en place.

Une réunion formelle mensuelle sera tenu à Antananarivo et les membres éloignés de l'équipe projet seront contacté par skype pour cette réunion.

Un plan de communication sera établi dès le début du projet pour valoriser les acquis et l'expertise.

### **Mise en commun des résultats**

Parallèlement à une liste de diffusion, un site web sera mis en place sur la cysticerose, à la fois dans un but de communication mais aussi d'échange entre les chercheurs. Une zone privée de ce site permettra le dépôt de documents relatifs au projet. Une zone ouverte permettra le dépôt de documents pédagogiques. Un webmaster sera désigné au sein du groupe pour gérer ce site.

### **Infrastructures et matériels mis à la disposition de la plateforme**

L'équipe regroupant majoritairement des partenaires d'Antananarivo, le projet permettra une dynamique scientifique débordant le cadre de cet appel d'offre. Une partie des partenaires sont déjà regroupés au sein d'une équipe d'accueil doctorale validée par l'université et le ministère. Ce projet sera l'occasion de formaliser des liens, pouvant conduire à la constitution d'une Unité mixte de recherche de droit malgache, sur la pathologie porcine. Les liens avec le CIRAD seront renforcés par ce projet et les demandes

communes ultérieures de crédit seront favoriser. La mise en place de module de formation facilitera la constitution d'une masse critique d'étudiants susceptibles de s'insérer ultérieurement dans l'équipe. La mise en place progressive d'un laboratoire d'enseignement au DESVM, permettra le transfert de technologie de l'IPM vers l'université.

## Ressources humaines

### Contact, coordonnées des personnes impliquées dans le projet

<b>Permanents :</b>					
Nom - Prénom	Organisme	Fonction	Activités dans le projet	Contacts	Durée (mois)
A. Rahantamalala	IPM	Chercheur	Coordinatrice du projet	ranjanirina@pasteur.mg	10
R. Jambou	IPM	Chef d'unité	Conseiller Scientifique / coordinateur de la thématique	rjambou@pasteur.mg	10
H. Rasamoelina	DESMV/ DRZV	Enseignant chercheur	Etudes épidémiologiques / Conception pédagogique / gestion des étudiants	harena23@yahoo.fr	10
V. Porphyre	CIRAD La Réunion	Chercheur	Conseiller Scientifique	vporphyre@gmail.com	10
E. Razafimanantsoa	DESMV	Enseignant chercheur	Conception pédagogique		
M. Ravakarivelo	DESMV/ DRZV	Chargé de cours	Conception pédagogique		
P. Nativel	IPM/France Volontaire	Ingénieur/Volontaire International	Clonage moléculaire	pnativel@pasteur.mg	10
M. Rakotondrazaka	IPM	Technicien supérieur	Purification de protéines recombinantes	mahenina@pasteur.mg	10
N Randrianasolo	IPM	Technicien	Production de protéines		10
P Ramandanirainy	IPM	Doctorant	Analyse de la réponse immunitaire	Rpriscaa@pasteur.mg	10
<b>Etudiants en stage de fin d'études</b>					
2 Etudiants	IPM/DRZV	Médecine Vétérinaire	Tests Immunologiques / épidémiologiques		8
2 Etudiant en DEA	Faculté Sciences	DEA Biochimie	Tests Immunologiques		8
<b>Partenaires extérieurs</b>					
M Vray	IPP	chercheur	épidémiologie		4
P Boireau	ANSES	Chef de département	serums controle		4
J Bellalou	IPP	Chef d'unité (PFPR)	Optimization de la production / modèle leishmania		4
J Chamot-Rocke	IPP	Chef d'unité	Analyse par MS/MS		4
Chefs de région	Directions régionales services vétérinaires		Coordination légale des actions	Région Moramanga et Analamanga	4

### Commentaires

Une équipe multidisciplinaire à la fois du Nord et du Sud

Les membres de l'équipe-projet sont issus de trois institutions bien établies (CIRAD, DESMV/DRZV, IPM). Des collaborations existent entre ces partenaires de longue date, mais particulièrement entre les membres de l'équipe cysticercose depuis 2010 par l'intermédiaire de stages d'étudiants, d'organisation de cours et de colloques. La collaboration entre la DRZV et les éleveurs porcins est établie depuis près de cinq ans à travers de multiples projets financés notamment par l'Union Européenne et le Welcome Trust. Des conventions lient l'IPM à la DSV et à la faculté de médecine. Les membres de l'équipe sont également directement impliqués dans les formations universitaires. Les membres de l'équipe seront impliqués d'une façon permanente et directe dans les activités à la fois de biologie, d'épidémiologie vétérinaire, et de formation. Cette équipe « Sud » est appuyée par les équipes de l'IP Paris (PF3, PF5) et de l'ANSES.

## Budget

Descriptif	Total	priorité
<b>1. Dépense de fonctionnement</b>		
Clonage et production de protéines recombinantes (10 protéines x 200)	2 000,00 €	1
mise au point de 8 tests ELISA	1 000,00 €	1
clonage en L tarentoale (4 proteines x 500 euros)	2 000,00 €	1
production de batch de protéines recombinantes (6 protéines x 1000euros)	6 000,00 €	1
étude du polymorphisme des protéines candidates (prélèvements / séquençage)	1 000,00 €	2
Production de TDR (2000 x 2euros)	4 000,00 €	1
missions d'étude de la filière porcine à Moramanga	2 000,00 €	1
Evaluation des TDR en elevages	2 000,00 €	1
consommables pour les travaux pratiques	1 000,00 €	2
<b>Sous-Total</b>	<b>21 000,00 €</b>	
<b>3. Dépenses de formation et de renforcement</b>		
petits matériels de laboratoire pour les travaux pratiques (DESVM)	2 500,00 €	2
bourses d'étudiants (3 x 10mois x 60 euros)	2 400,00 €	1
mise en place d'un site web et d'une plateforme d'échange	1 500,00 €	2
frais de secretariat et de communications (DESVM)	1 200,00 €	1
échanges de matériels (expédition pour analyse en France)	1 000,00 €	2
<b>Sous-total</b>	<b>8 600,00 €</b>	
Frais de gestion	2 368,00 €	
<b>Total Général</b>	<b>31 968,00 €</b>	

### Financement non inclus

- Une bourse d'étudiant vétérinaire déjà en place (IPM)
- Une mission de formation sollicitée, bourse BGF (Dr Anjanirina)
- Analyse spectroscopique déjà financée (Project Qualireg : UE La Réunion)
- Un salaire d'ingénieur biotechnologie déjà financé pour deux ans (Région Reunion / AFV)

### Co-financements

#### Demandes de financement en cours

- Gates foundation « One Health »: 100 000 USd (Mai 2013)
- PARRAF (ministère Aff. Etrangères) : 30 000 euros (Mars 2013)
- Bourse BGF : stage à la PFPR transfert de technologie (1mois+avion) (Octobre 2013)

#### Financements déjà obtenus

- Projet Qualireg (UE/ Région Réunion) : 15000 euros (juin 2013)
- Ambassade de Suisse : 10 000 euros (janvier 2013)
- Région Reunion / AFV : un poste d'ingénieur biotechno pour deux ans (janv 2012)
- Agence Universitaire de la Francophonie : 20 000 euros (Mai 2011)
- Ambassade de France : 7000 euros (sept 2011)
- Projet interne IPM : 7500 euros (sept 2010)

### Justification

Le budget se repartit en 4 volets :

- Une participation au développement et à la production d'un test rapide pour el diagnostic de la cysticercose porcine

- L'organisation d'enquête/formation sur la zone d'étude et la mise en œuvre pratique des tests sur le terrain,
- la mise en place de structure de collaboration au sein du groupe de travail et le soutien du DESVM pour la connexion et les études de terrain
- le soutien à la mise en place d'enseignements pratiques et théoriques au DESVM.

## Risques

### WP1

Les risques des différentes phases sont les suivants :

- Phase 1 :

Retard de la publication du génome de *Taenia solium* nécessaire pour l'identification en MS/MS des protéines intéressantes du liquide de kyste. Les banques d'EST seront utilisées mais leur qualité peut être insuffisante.

- Phase 2 et 3 :

-L'antigénicité des protéines exigeant une maturation post-traductionnelle (cas des protéines glycosylées par exemple) ce qui ne peut se faire dans un système procaryote tel que *E.coli* : un système de clonage eucaryote sera utilisé et transféré à Madagascar.

-Les réactions croisées avec les antigènes d'autres parasites proches de *Taenia solium* (les autres helminthes) lors des tests d'évaluation peuvent limiter les performances du test ;

-Les protéines obtenues ne permettent pas de développer des tests avec une sensibilité et spécificité suffisante : plusieurs protéines seront utilisées simultanément dans le même test.

- Phase 4 :

-La stabilité des tests est insuffisante pour leur utilisation sur le terrain par les éleveurs eux même, dans un délai compatible avec leur distribution : le process devra être amélioré par les industriels eux même puisque ces difficultés ont été résolues pour tous les tests précédents

- des polymorphismes sont identifiés pour ces protéines de part le monde : l'impact de ces polymorphismes sera évalué sur la réaction avec les sérums, en utilisant des sérums de ces régions et plusieurs isoformes pourraient être utilisées simultanément.

### WP2

La base méthodologique de ce volet étant l'approche participative des villageois pour des enquêtes de description de la filière et pour leur formation à travers une démarche d'analyse force/faiblesse. Le risque principal est une faible adhésion des personnes à la démarche. On veillera à optimiser cette adhésion en choisissant la période d'étude (hors travaux des champs etc), en s'entourant de personnes-relais et d'autorités locales, en mobilisant les vétérinaires régionaux.

### WP3

Aucun risque spécifique n'est envisagé pour ce volet si ce n'est un retard de rédaction des maquettes de masters. La mise en place des travaux pratiques sera simple mais leur pérennisation est à discuter dans le cadre global du passage au LMD.

## Indicateurs d'évaluation / succès

- Un test de diagnostic rapide utilisable chez les éleveurs

Le développement de ce test rapide basé sur des protéines recombinantes est innovant à Madagascar et aucun autre test n'est actuellement disponible. L'évaluation de l'avancé du projet se fera sur i) l'identification de fractions protéiques d'intérêt dans le liquide de kyste (10 fractions identifiées de façon reproductible dans les extraits parasitaires par chromatographie et western blot) ii) l'identification des protéiques d'intérêt dans 4 de ces fractions par MS/MS, iii) le clonage et l'expression de 9 protéines correspondant à ces protéines d'intérêt, iv) la mise au point de tests ELISA pour les protéines clonées, v) la production de test rapide utilisant une ou plusieurs des meilleures protéines recombinantes, vi) son évaluation en termes de valeur prédictive positive et négative par rapport aux sérums déjà prélevés.



## Bibliographie

Andriamanana, O. M (2013). *Thèse de Médecine Vétérinaire*. Université d'Antananarivo

Andriamparany, H.M. (2012) *Thèse de Médecine Vétérinaire*. Université d'Antananarivo

Corpa *et al.* [Vet Parasitol.](#) 2013 Mar 31;193(1-3):281-3.

Dorny, P 2004. *Trends Parasitology*. 20, 259–260.

Garcia HH, 2001. *Am J Trop Med and Hyg* 65: 31-32.

Gekeler F, *et al.* *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002 21 : 227-9.

Lee EG, *et al.* *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2005 99(12):919-26.

Lovadina, J., (2012). *Thèse de Pharmacie*. Université de Grenoble

### UNITE D'IMMUNOLOGIE - Institut Pasteur de Madagascar (2009-2013)

H. Rasamoelina Andriamanivo, V. Porphyre, **R. Jambou** Pitfalls in control of cysticercosis in Madagascar. *Trends in parasitology*, in correction

Fatima El Hassan, Valery Combes, Georges Emile Grau, **Ronan Jambou** Potential efficacy of Citicoline as adjunct therapy for cerebral malaria AAC in press

V Andrianaivoarimanana, M Rajerison, JM Duplantier, E Carniel, **R Jambou** Stabilisation of plague foci: when polymorphism and fitness matter , *Plos negl Dis* in press

R Razakandrainibe, V Combes, GE Grau and **R Jambou** Crossing the wall: opening of endothelial junction during infectious diseases *Infect Immunity* , in press

Andrianaivoarimanana V, Telfer S, Rajerison M, Richard V Ranjalaha M, Rahalison L and **Jambou R.** Immune Response of wild *Rattus rattus* during Infection with *Yersinia pestis*: epidemiological implications **PlosOne (2012)**

Pelleau S, Diop S, Dia Badiane M, Vitte J, Beguin P, Nato F, M. Diop BM, Bongrand P, Parzy D, **Jambou R.** Basophil reactivity increases during severe malaria and is modulated by PfTCTP. **Infection and immunity (2012)**

Razakandrainibe R, Pelleau S, Grau GE and **Jambou R** Endothelial cells during infectious diseases: is there a role for antigen presentation **Trends in Parasitology (2012)**

Offianan A Toure, Louis K Penali, Coulibaly MA, Tiacoh NL, Berenger Aristide A. Ako Adji EG, Coulibaly B, Koffi D, Sarr D, **Jambou R** and Kone M Comparative Efficacy of Uncontrolled and Controlled Intermittent Preventive Treatment During Pregnancy (IPTp) in High Resistance Area to Sulfadoxine-Pyrimethamine in Côte d'Ivoire. **Infection and Drug Resistance.** (2012)

M. Boussard, L Millon, F Grenouillet, **R. Jambou** Prévention et traitement de la cysticercose *Journal des Anti-infectieux* (2012) 14, 143—150

**Jambou R,** El-Assaad F, Combes V, Grau GE. In vitro culture of Plasmodium berghei-ANKA maintains infectivity of mouse erythrocytes inducing cerebral malaria, **Malaria j** (2011)

**Jambou R,** Le Bras J, Randrianarivojosia M Pitfalls in new artemisinin-containing antimalarial drug development. **Trends in Parasitology** (2011)

Pelleau P, Bertaux L, Briolant S, Ferdig MT, SinouV , Pradines B, Parzy D and **Jambou R**. Worldwide genetic polymorphism of *Plasmodium falciparum* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger and its association with quinine and chloroquine responses **Antimicrobial Agent Chemothera** (2011)

**Jambou R**, Combes V, Jambou MJ, Weksler BB, Couraud PO and Grau GE *Plasmodium falciparum* adhesion on human brain microvascular endothelial cells involves transmigration-like cup formation and induces opening of intercellular junctions. **Plos Pathogen** (2010)

**Jambou R**. Response to comments to "Comparison of ELISA and PCR assays for the diagnosis of porcine cysticercosis". **Veterinary Parasitology** (2010)

Ramahefarisoa MR, Rakotondrazaka M, **Jambou R**, Jean-François Carod JF. Comparison of ELISA and PCR assays for the diagnosis of porcine cysticercosis. **Veterinary Parasitology** (2010)

**Jambou R**, Martinelli A, Pinto J, Gribaldo S, Legrand E, Niang M, Kim N, Pharath L, Volnay B, Ekala MT, Bouchier C, Fandeur T, Berzosa P, Benito A, Ferreira ID, Ferreira C, Vieira PP, Alecrim MG, Mercereau-Puijalon O, Cravo P Geographic structuring of the *Plasmodium falciparum* Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase (PfSERCA) gene diversity . **Plos One** (2010)

Bob NS, Diop BM, Marrama L, Tall A, Renaud F, Durand P, Ka B, Hovette Ph, Seck SY, Soeur Marie Madeleine, Ekala MT, Bouchier C, Mercereau-Puijalon O, **Jambou R**. Cerebral malaria in urban West Africans is associated with high polymorphism of parasites isolates (Dakar, Senegal). **Plos One** (2010)

D Sarr , E Frealle, L Marrama, D Aldebert, A Gaye, HO Brahim, M Niang, JM Dangou, O Mercereau-Puijalon, JY Lehesran, R **Jambou**. COX-2 is up-regulated in placenta during malaria infection in area of low transmission . **Malaria J** (2010)

Combes V, El-Assaad F, Faille D, **Jambou R**, Hunt NH, Grau GE Microvesiculation and cell interactions at the brain-endothelial interface in cerebral malaria pathogenesis. **Prog Neurobiol**. (2010) 91:140-51.

**Jambou R**, Combes V & Grau GE, Citicoline and membranes protectors: an indication in infectious diseases?. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology (Molecules in Focus)** 2009

Diop S, Ndiaye M, Seck M, Chevalier B, **Jambou R**, Sarr A, Dièye TN, Touré AO, Thiam D, Diakhaté L. Prevention of transfusion transmitted malaria in endemic area **Transfus Clin Biol**. 2009 16(5-6):454-9.

Rabarijaona LP, Randrianarivoelosia M, Raharimalala LA, Ratsimbasoa A, Randriamanantena A, Randrianasolo L, Ranarivelo LA, Rakotomanana F, Randremanana R, Ratovonjato J, Rason MA, Duchemin JB, Tall A, Robert V, **Jambou R**, Ariey F, Domarle O. Longitudinal survey of malaria morbidity over 10 years in Saharevo (Madagascar): further lessons for strengthening malaria control. **Malar J**. 2009 Aug 6;8:190

**Rahantamalala A**, Rech P, Martinez Y, Chaubet-Gigot N, Grima-Pettenati J, Pacquit V. Coordinated transcriptional regulation of two key genes in the lignin branch pathway--CAD and CCR--is mediated through MYB- binding sites. **BMC Plant Biol**. 2010 Jun 28;10:130.

## **FOFIFA/DRZV CIRAD**

**Rasamoelina Andriamanivo, H.** (2006) Contribution a l'étude de l'épidémiologie de la peste porcine africaine dans la zone d'Arivonimamo, à Madagascar. *Mémoire CEAV-PARC*, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse

**Rasamoelina Andriamanivo, H.** La Cysticercose porcine à Madagascar. Keynote speaker au Colloque Conjoint Parasitologie-Célébration Vet 2011 : Circulations des zoonoses et parasites dans l'Océan Indien. Académie Malgache, Novembre 2011.

## Annexes

### Identification des protéines contenues dans le liquide de kyste parasite :

Les cysticerques sont disséqués et préparés selon Divan et Michault (Divan et al., 1982; Michault et al., 1988). Les protéines solubles du liquide de kystes sont extraites par deux étapes progressives de centrifugation (à 5.000 g puis à 41.000 g) puis dessalés par gel de filtration sur Sephadex G-25 ®... Les protéines sont ensuite séparées selon leur charge par chromatographie échangeuse d'anions ou AIEX et éluées par gradient linéaire de NaCl. Les fractions sont analysées par western blot avec les sérums de porc ladre. Les fractions d'intérêt sont séparées à nouveau par électrophorèse bidimensionnelle puis transférées à nouveau sur nitrocellulose. Les spots d'intérêt sont identifiés à nouveau par western blot. Les spots correspondants sont découpés dans l'acrylamide et adressés à la PF3 pour Spectrométrie MS-MS.

### Production d'antigènes recombinants

Une banque d'ADNc est préparée à l'aide de l'enzyme SuperScript™ II RT (Invitrogen), à partir des ARN totaux extraits des cysticerques par le Trizol (Invitrogen). Chaque gène de *Taenia solium* à cloner est amplifié utilisant la banque d'ADNc et des amorces spécifiques délimitées par un site d'enzyme de restriction pour le clonage ultérieur. Chaque gène purifié à l'aide d'un kit (Nucleospin Extract II, Macherey-Nagel) est introduit dans un vecteur plasmidique (pET16b, Novagen) préalablement ouvert par les mêmes enzymes de restriction introduits. Le plasmide recombinant ainsi obtenu porte le gène, en amont duquel se trouve un tandem de 10 séquences codant des tags Histidines. Le criblage des clones se fait en transformant *E. coli* (One Shot® TOP 10, Invitrogen) par choc thermique et en étalant sur milieu LB (Sambrook et al., 1989) contenant les antibiotiques de sélection. L'introduction du gène est vérifiée par PCR utilisant les amorces du plasmide (T7, Sigma) et celles du gène spécifique cloné. Les plasmides recombinants des clones positifs sont isolés à l'aide d'un Kit (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Après vérification du gène par séquençage, chaque plasmide recombinant est introduit dans *E. coli* d'expression (One Shot® BL21DE(3), Invitrogen) pour exprimer la protéine correspondante. Le test d'expression protéique est effectué à 37°C sur milieu LB avec les antibiotiques adéquats, en induisant avec 1mM d'IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside, Euromedex) à une D.O. entre 0.5 et 1. L'induction est réalisée pendant 3 à 4 heures à 37°C. La culture bactérienne est ensuite centrifugée à 9 000rpm pendant 10minutes. Le culot bactérien ainsi obtenu est lavé avec du Tampon A (Tampon Phosphate 50mM, 300mM NaCl, pH 8). La protéine recombinante est extraite par lyse bactérienne à 37°C pendant 20min (Tampon de lyse : Tampon A, Benzonase, Inhibiteurs protéases, 10 mM Imidazole, 1mg/ml Lysozyme, 0.1% Trinton X-100). La fraction protéique soluble est obtenue par centrifugation à 13 000rpm pendant 30 minutes. La protéine recombinante est purifiée par chromatographie d'affinité utilisant la résine, TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech). La protéine recombinante est éluée avec du Tampon A contenant 300 mM d'imidazole (Sigma).

### Développement de nouveaux tests TDR utilisant les antigènes recombinants et leur validation sur l'élevage

- **Principe**

La bandelette est destinée à détecter la présence d'IgG dirigées les protéines recombinantes dans les sérums. Pour la réalisation d'un test ICT de détection des anticorps, deux modalités sont possibles selon que l'antigène puisse être couplé à l'or colloïdal ou non. Pour les tests mis au point pour la peste, l'antigène F1 est couplé à l'or. Il migre avec le sérum à tester. La capture se fait par un anti-IgG immobilisé sur la membrane qui retient le complexe IgG du malade / antigène-gold. Pour la leptospirose un autre principe a été adopté car l'antigène utilisé est particulaire et complexe. Il n'a pas été réalisé d'essai de couplage à l'or colloïdal. Le principe retenu a été très proche de celui d'un western-blot avec un antigène déposé sur la membrane et un anti-IgM couplé à l'or qui migre avec le sérum du malade. L'avantage de ce test est qu'il est très facilement adaptable à d'autres espèces (rats, bovins etc) ou à la détection IgG. L'antigène immobilisé est un extrait bactérien Hursbridge. La phase mobile est un Goat

anti Human Ig M couplé à l'or colloïdal. Le contrôle positif du test est constitué par un IGM humaine purifié directement déposé sur la membrane de polyester.

Pour la cysticercose les deux possibilités seront testées selon le nombre de protéines que l'on aura sélectionné. Dans un premier temps il est très aisée de réaliser des tests multi protéines avec la deuxième méthode puisque les dépôts sur le polyester sont séparés (principe des tests HIV ou paludisme).

- **Protocole**

Le test utilisera un montage classique avec :

- deux buvards (Réf 903 Schleicher et Schuell); sur l'un d'eux sont lyophilisés le tampon et le conjugué marqué à l'or (tampon 50mM Phosphate de sodium dibasique 3% de sucrose et 3% de BSA). C'est ce buvard qui est trempé dans le sérum;
- un polyester Accuflow P monté entre les deux buvards sur lequel est déposé une ligne contrôle (IgG humaine purifié), et une ligne antigène (protéine recombinante). Le dépôt est réalisé sur un appareil Bio-Dot automatique sur des feuilles de polyester, découpées ensuite en bandelette à l'aide d'un cutter automatique Biodot. Des séries de 500 à 1000 bandelettes sont faites en routine à l'IPM sur ces appareils pour les tests Peste.

- **Packaging**

Un packaging provisoire sera réalisé selon la même procédure que pour les tests Peste (emballage individuel avec déshydratant).

- **Test de stabilité**

La stabilité sera évaluée comme pour les tests Peste selon les protocoles classiques :

- test accéléré à 60°C pendant 3 semaines (équivalent 2 ans à température ambiante)
- test à +4°C pendant 2ans
- test à température ambiante pendant 2ans