

Recherche pour la référence

Identification d'antigènes précoces de *Trichinella spiralis* et leur application au développement d'un ELISA pour le diagnostic de la trichinellose chez le porc

A. Zocovic, S.-A. Lacour, B. Giovani, P. Mace, I. Vallée, P. Boireau, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort, ENVA, UPEC, UMR BIPAR, Maisons-Alfort, France

A. Zocovic, S.-A. Lacour, B. Giovani, P. Mace, I. Vallée, P. Boireau (2010). Identification d'antigènes précoces de *trichinella spiralis* et leur application au développement d'un ELISA pour le diagnostic de la trichinellose chez le porc, EuroReference, No. 4, ER04-10R01. <http://www.anses.fr/euroreference/numero4/PN5001.htm>



La trichinellose est une zoonose parasitaire provoquée par la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite d'animaux contaminés par des larves du nématode du genre *Trichinella*. Si le dépistage parasitaire direct est actuellement la seule méthode préconisée pour contrôler officiellement les carcasses à l'abattoir, l'introduction des méthodes sérologiques dans la nouvelle réglementation relative aux zoonoses parasitaires en Europe encourage leur développement.

Trichinella et trichinellose

La trichinellose est une zoonose provoquée par la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite d'animaux infestés par des larves du parasite *Trichinella*. Cette zoonose possède une répartition mondiale et est notamment liée aux habitudes alimentaires et culinaires (Blaga *et al.*, 2007). La trichinellose humaine est une maladie régulièrement émergente/ré-émergente dans différentes parties du monde. Une étude estime à 11 millions le nombre de personnes contaminées sur les différents continents (Dupouy-Camet, 2000). Les porcs domestiques demeurent la principale source de transmission du parasite à l'Homme au niveau mondial mais le véritable réservoir semble être représenté par les carnivores sauvages (Devine, 2003; Pozio, 1998).

Trichinella est un nématode parasite singulier puisque c'est le seul pluricellulaire à connaître un développement intracellulaire strict chez l'animal. *Trichinella* utilise une niche particulière, la cellule musculaire de vertébrés. Ce nématode appartient à la famille des *Trichinellidae* comprenant douze espèces/génotypes apparentés en deux groupes phylogénétiquement distincts: d'une part les trichines encapsulées (*T. spiralis*, *T. nativa*, T.T6, *T. britovi*, T.T8, *T. murrelli*, T.T9, *T. nelsoni*, T.T12) qui infectent les mammifères, et d'autre part les trichines non encapsulées (*T. pseudospiralis*, *T. papuae*, *T. zimbabwensis*) qui infectent les mammifères et également les oiseaux et les reptiles (Pozio, 2001).

Le cycle biologique de ce parasite est auto-hétéroxène: *Trichinella* se développe chez un même hôte qui est à la fois hôte intermédiaire et hôte définitif. La digestion de viande contaminée, consommée crue ou peu cuite, libère les larves L1 qui pénètrent dans l'épithélium intestinal où elles vont muer en stades larvaires L2, L3, L4 jusqu'aux vers adultes sexués en quelques heures (Figure 1). Les femelles fécondées expulsent des larves L1 Nouveau-Nées (L1NN) qui gagnent les muscles striés via la circulation lymphatique et sanguine entre 4 et 6 jours post-infestation (pi). Ces larves L1NN pénètrent dans les cellules musculaires dont elles induisent la différenciation en cellules nourricières entourées ou non d'une capsule de collagène protectrice. De façon concomitante, les larves L1NN évoluent en larves L1 Musculaire (L1M) correspondant au stade de développement infestant (Figure 2).

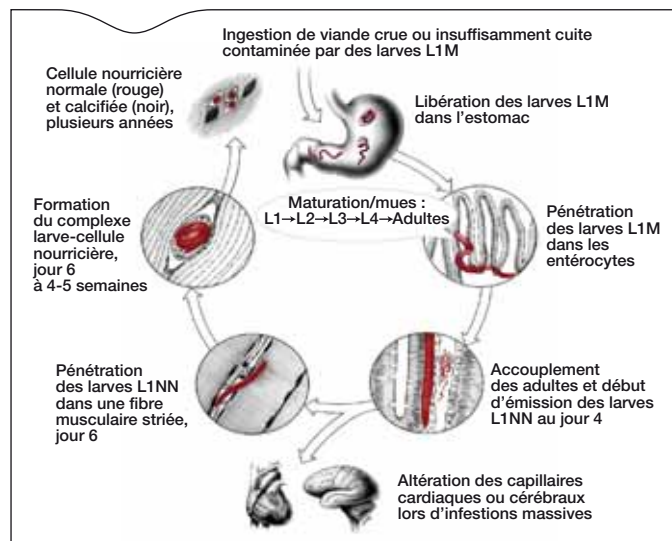


Figure 1. Cycle parasitaire de *T. spiralis* (modifié d'après Despommier *et al.*, 2000) (UMR BIPAR, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort).

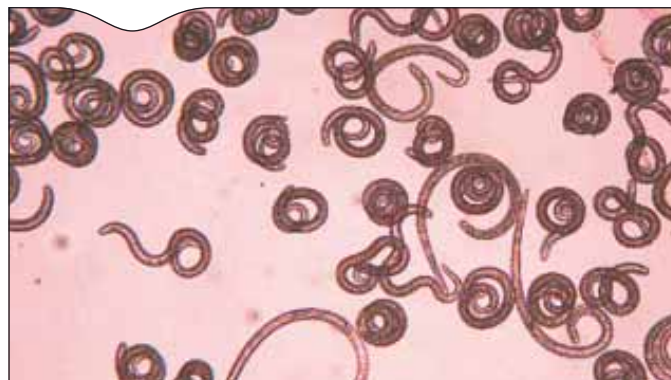


Figure 2. Observation au microscope (grossissement 80X) de larves L1M de *T. spiralis* (UMR BIPAR, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort).

Recherche pour la référence

Réglementation européenne

Si le dépistage parasitaire direct est actuellement la seule méthode préconisée pour contrôler officiellement les carcasses à l'abattoir, il n'en demeure pas moins que la sérologie a un réel intérêt de par sa plus grande facilité d'utilisation, son moindre coût et son automatisabilité possible. Cependant, dans les conditions actuelles, le règlement européen (CE) n° 2075/2005 introduit les méthodes sérologiques exclusivement pour le suivi des élevages de porcs déclarés indemnes de trichinellose ainsi que dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques au sein de la Communauté européenne. Cela nécessite au préalable de disposer d'un test approprié et validé par le laboratoire de référence de l'Union européenne pour les parasites (*Istituto Superiore di Sanita*, Rome, Italie).

Problématique

Actuellement, le seul test sérologique disponible est un ELISA indirect basé sur l'utilisation des antigènes Excrétion/Sécrétion (E/S) du stade L1M de *Trichinella* (Nockler *et al.*, 2009). Ce stade correspond à la forme tardive du parasite. Le test ELISA E/S offre une sensibilité supérieure à 98 % mais présente certains inconvénients. En effet, il ne permet pas la détection d'animaux présentant une infestation récente (moins d'un mois), et induit donc l'existence d'une « fenêtre aveugle » de détection (Nockler *et al.*, 1995). De plus, la détection d'animaux avec une dose infestante faible n'est pas systématique (Nockler *et al.*, 1995). Il est donc envisageable de mettre au point un test alternatif à l'ELISA E/S. Ce test devra permettre une détection plus précoce de l'infection, particulièrement pour le dépistage des animaux domestiques. Il devra également présenter une spécificité élevée notamment pour le dépistage de la faune sauvage.

Objectifs et stratégie

Les objectifs du travail de thèse engagé devaient permettre :

- d'identifier et caractériser des antigènes très précoces des stades infestants de *Trichinella* présents dans la muqueuse intestinale;
- de développer un test ELISA permettant une détection plus sensible, plus spécifique ainsi que plus précoce que l'ELISA E/S de la trichinellose chez le porc.

La stratégie développée a nécessité deux étapes. La première a consisté en la construction de banques d'ADN complémentaires à des stades intestinaux invasifs de *T. spiralis*, espèce de *Trichinella* la plus souvent identifiée au sein des élevages de porcs en Europe et dans le monde (Pozio & Murell, 2006). À notre connaissance, aucun gène spécifiquement exprimé avant le stade adulte 3 jours n'a été décrit à ce jour (Boireau *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2009). Ainsi, selon les données disponibles dans la littérature, trois cibles particulières ont été choisies afin d'être analysées vis-à-vis de leur antigénicité : les stades pré-adultes larvaires 14 h pi (stade L2) et 20 h pi (stade L3) (Khan, 1966) ainsi que le stade « jeune adulte » 48 h pi. Dans un second temps, un immunocriblage en système procaryote a été réalisé afin de sélectionner des antigènes correspondants. Pour ce faire, l'utilisation en parallèle d'un sérum polyclonal et des anticorps produits dans le surnageant de culture d'intestins de porcs infectés par *T. spiralis* a été retenue (Figure 3).

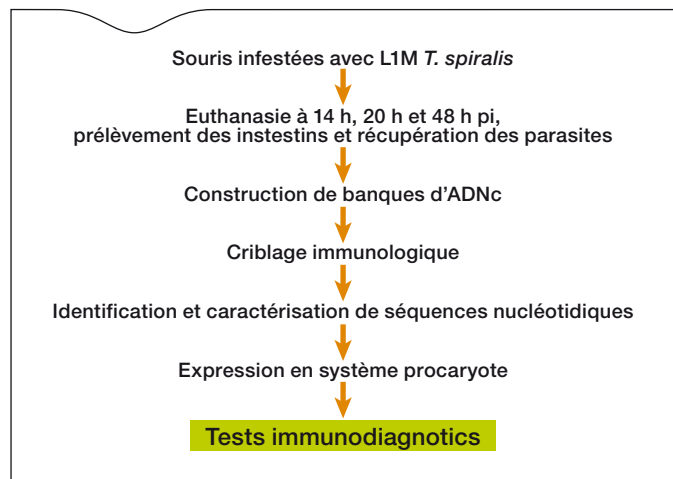


Figure 3. Description de la stratégie mise en place afin d'identifier des antigènes immunodominants de *T. spiralis* (UMR BIPAR, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort).

Résultats

Plus d'une centaine de phages recombinants ont été collectés et leur insert a été séquencé. Les résultats obtenus ont permis de mettre en avant le rôle potentiel de protéines telles que les protéases à sérine ou bien les protéines de choc thermique durant les phases précoces de l'infection. De l'analyse des séquences identifiées, deux nouvelles cibles particulières ont été sélectionnées et testées vis-à-vis de leur antigénicité. Les protéines recombinantes exprimées chez *E. coli* ont été purifiées et leur antigénicité a été démontrée par Western blot. Un test ELISA prototype utilisant ces protéines antigéniques a donc été développé (Figure 4). Cet ELISA présente pour les porcs avec une forte infestation (20000 L1M) testés, la même sensibilité que l'ELISA E/S, seule référence actuelle. De plus, il offre un gain de précocité de 1 à 2 semaines comparativement

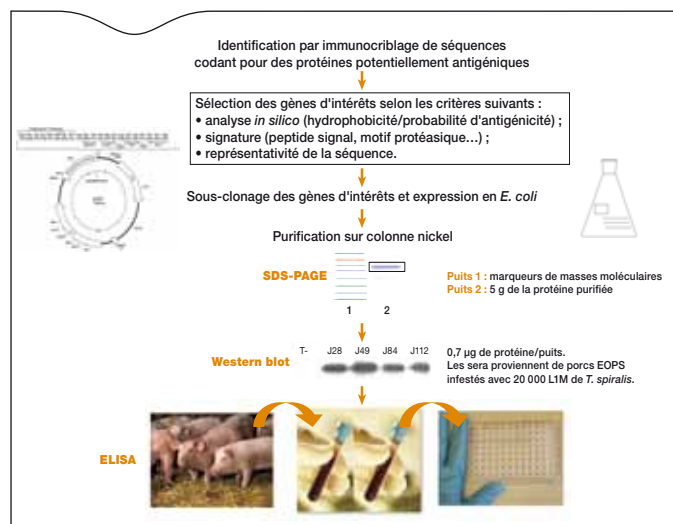


Figure 4. Schéma présentant les étapes essentielles jusqu'au développement de l'ELISA prototype (UMR BIPAR, Anses Laboratoire de santé animale de Maisons-Alfort).

Recherche pour la référence

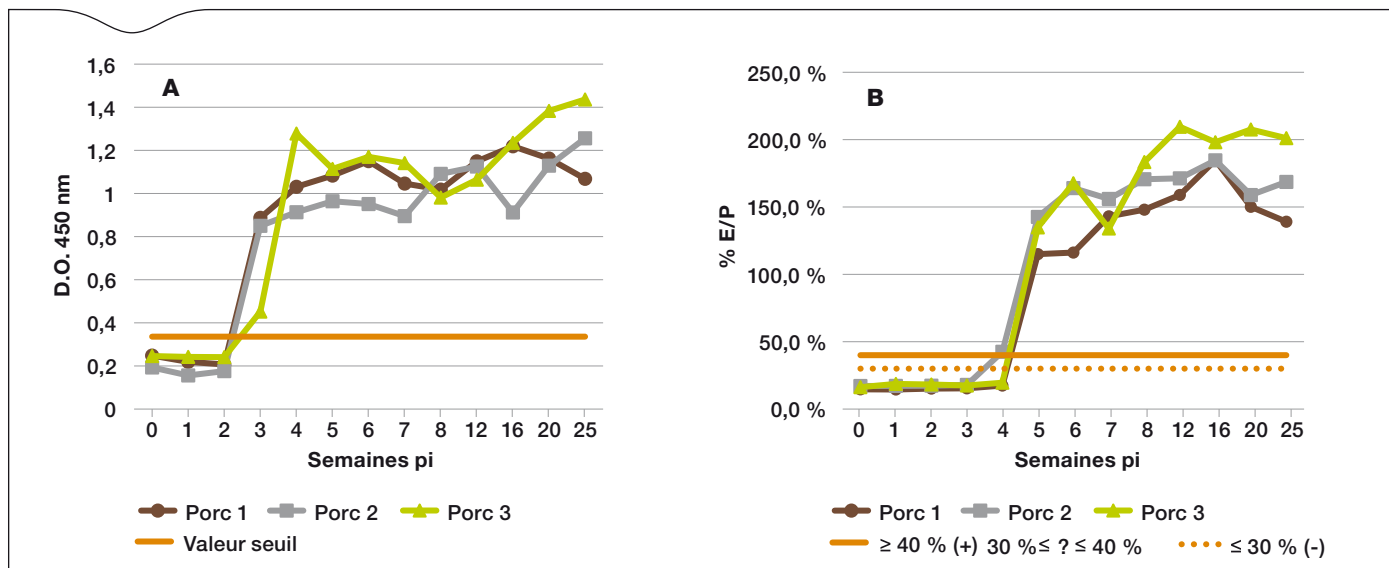


Figure 5. (A) Cinétique de la densité optique (D.O.) mesurée par l'ELISA développé. (B) Cinétique de la réponse humorale mesurée par l'ELISA E/S (Pourquier® ELISA Trichinellose Sérum Monocupule, Institut Pourquier, Montpellier, France) et exprimée en % E/P, défini comme suit: (D.O. 450 de l'échantillon à tester) / (D.O. 450 moyenne de l'échantillon de contrôle positif) x 100. Les sérums proviennent de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques expérimentalement infestés avec 20 000 larves L1M de *T. britovi*.

à l'ELISA E/S. En outre, une persistance de la détection au-delà de 20 semaines a été observée avec l'ELISA développé (Figure 5). En ce qui concerne les infestations modérées (1 000 L1M) et faibles (200 L1M), la sensibilité de l'ELISA prototype est inférieure à celle de l'ELISA E/S pour les porcs testés. Cependant, l'association de ces nouveaux antigènes avec les protéines NBL1 et 411, précédemment identifiées au laboratoire (Boireau *et al.*, 2006), pourrait permettre d'augmenter la sensibilité du test.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un brevet: Zocevic, A., Lacour, S.A., Giovani, B., Mace, P., Vallée, I., Boireau, P. Antigènes polypeptidiques de *Trichinella* et leurs applications. Brevet 1000660. 17 février 2010.

Conclusion

Par une approche originale, plusieurs gènes jouant probablement un rôle clef dans l'invasion de l'intestin et la survie du parasite ont été identifiés. De plus, deux antigènes sont des candidats envisageables pour le diagnostic par ELISA des trichinelloses chez le porc. En conséquence, des analyses complémentaires seront réalisées. Des essais de vaccination de porcs avec ces antigènes sont envisagés compte tenu des résultats obtenus avec d'autres antigènes recombinants également disponibles au laboratoire.

Références bibliographiques

Blaga, R., Durand, B., Antoniu, S., Gherman, C., Cretu, C.M., Cozma, V., Boireau, P., 2007, A dramatic increase in the incidence of human trichinellosis in Romania over the past 25 years: impact of political changes and regional food habits. *Am J Trop Med Hyg* 76, 983-986.

Boireau, P., Vayssier, M., Fabien, J.-F., Perret, C., Calamel, M., Soule, C., 1997, Characterization of eleven antigenic groups in *Trichinella* genus and identification of stage and species markers. *Parasitology* 115, 641-651.

Boireau, P., Mingyuan, L., Baoquan, F. *et al.* Utilisation de deux antigènes identifiés chez *Trichinella*, NBL1 et 411, pour le diagnostic précoce de la trichinellose. Brevet 0601058. 7 février 2006.

Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J., Knirsch, C.A., 2000, *Trichinella spiralis*. In: "Parasitic Diseases" Despommier, D.D., Gwadz, R.W., Hotez, P.J., Knirsch, C.A. (ed) Apple Trees Productions, LLC. New York, 125-132.

Devine, R., 2003, La consommation des produits carnés. *INRA Productions Animales* 16, 325-327.

Dupouy-Camet J., 2000, Trichinellosis: a worldwide zoonosis. *Vet Parasitol* 93, 191-200.

Gamble, H.R., Pozio, E., Bruschi, F., Nockler, K., Kapel, C.M., Gajadhar, A.A., 2004, International Commission on Trichinellosis: recommendations on the use of serological tests for the detection of *Trichinella* infection in animals and man. *Parasite* 11, 3-13.

Khan, Ali Z., 1966, The postembryonic development of *Trichinella spiralis* with special reference to ecdysis. *J Parasitol* 52, 248-259.

Liu, M.Y., Wang, X.L., Fu, B.Q., Li, C.Y., Wu, X.P., Le Rhun, D., Chen, Q.J., Boireau, P., 2007, Identification of stage-specific expressed genes of *Trichinella spiralis* by suppression subtractive hybridization. *Parasitology* 135, 1-13.

Nockler, K., Reckinger, S., Broglia, A., Mayer-Scholl, A., Bahn P., 2009, Evaluation of a Western Blot and ELISA for the detection of anti-*Trichinella*-IgG in pig sera. *Vet Parasitol* 163, 341-347.

Nockler, K., Voigt, W.P., Protz, D., Miko, A., Ziedler, K., 1995, Diagnosis of trichinellosis in living pigs using indirect ELISA. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 108, 167-174.

Pozio, E., 1998, Trichinellosis in the European Union: Epidemiology, Ecology and Economic Impact. *Parasitol Today* 14, 35-38.

Pozio, E., 2001, New patterns of *Trichinella* infection. *Vet Parasitol* 98, 133-148.

Pozio, E., Murrell, K.D., 2006, Systematics and epidemiology of *Trichinella*. *Adv Parasitol* 63, 367-439.

Wu, X.P., Fu, B.Q., Wang, X.L., Yu, L., Yu, S.Y., Deng, H.K., Liu, X.Y., Boireau, P., Wang, F., Liu, M.Y., 2009, Identification of antigenic genes in *Trichinella spiralis* by immunoscreening of cDNA libraries. *Vet Parasitol* 159, 272-275.