UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
ECOLE DOCTORALE « SCIENCES DE LA VIE, DE LA SANTÉ ET DE L'ENVIRONNEMENT »
FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE, D'ODONTO-STOMATOLOGIE

Année : 2010 N° d'ordre : 01

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : **Biologie et Pathologies Humaines**

Présentée par

PAPA MAKHTAR DRAMÉ

Relation Homme-Vecteur au cours du paludisme : développement d'un nouvel outil immuno-épidémiologique évaluant l'efficacité de la lutte anti-vectorielle

Soutenue le **22 Décembre 2010 à 15 heures** devant le jury composé de :

Président : SALL Niama Diop, Professeur Titulaire, FMPOS, UCAD

Rapporteurs : FAYE Ousmane, Professeur Titulaire, FST, UCAD
FAYE Babacar, Maître de Conférences Agrégé, FMPOS, UCAD

Examinateurs : TOGUEBAYE Bhen Sikina, Professeur Titulaire, FST, UCAD
REMOUÉ Franck, Chargé de Recherche, IRD (Co-Directeur de thèse)

Directeur de thèse : SEMBÈNE Mbacké, Maître de Conférences, FST, UCAD

Table des matières

Remerciements.....-1-

Table des tableaux.....-4-

Table des figures.....-5-

Cadre des travaux de thèse.....-9-

Introduction.....-12-

Première partie

Le paludisme.....-16-

Chapitre I : *Généralités sur le paludisme*.....-17-

I-1- Historique.....-18-

I-2- Epidémiologie du paludisme.....-19-

I-2-1- Importance médicale du paludisme.....-19-

Dans le monde.....-19-

En Afrique.....-20-

En Angola.....-21-

Au Sénégal.....-21-

I-2-2- Les protagonistes.....-22-

I-2-2-1- Les agents pathogènes.....-22-

a- Les *Plasmodium* humains.....-22-

b- Cycle de développement de *Plasmodium*.....-23-

b-1- Schizogonie chez l'Homme.....-24-

- La phase hépatique.....-25-

- La phase érythrocytaire.....-25-

b-2- Sporogonie chez le moustique femelle.....-26-

I-2-3- Méthodes diagnostiques de l'infection.....-26-

I-2-3-1- Diagnostic clinique : évaluation de la morbidité.....-26-

I-2-3-2- Diagnostic biologique.....-28-

I-2-3-2-1- Diagnostic biologique non spécifique.....-28-

I-2-3-2-2- Diagnostic biologique spécifique.....-28-

a- *Les techniques microscopiques conventionnelles*……..-28-
- Le frottis mince……..-28-
- La goutte épaisse……..-28-
- L'apposition placentaire……..-29-
b- *QBC™ Malaria test*……..-29-
c- *Tests de diagnostic rapide (TDR) par immunocapture d'antigènes plasmodiau*..-30-
d- *Méthodes immunologiques : la sérologie*……..-31-
e- *Tests moléculaires*……..-33-
I-2-4- Pathogenèse et Symptomatologie du paludisme……..-33-
I-2-4-1- Infection asymtômatique et immunité de prémunition……..-34-
I-2-4-2- Accès simple ou de primo-invasion……..-34-
I-2-4-3- Accès sévère……..-35-
- Anémie sévère……..-35-
- Accès pernicieux ou neuropaludisme……..-36-
I-2-5- Vecteurs du paludisme en Afrique et quelques éléments de leur bio-écologie……..-37-
I-2-5-1- Vecteurs du paludisme en Afrique……..-37-
I-2-5-2- Cycle de développement des anophèles……..-41-
- La phase aquatique……..-42-
- La phase imaginale……..-43-
I-2-5-3- Le cycle trophogonique des anophèles……..-43-
- La recherche de l'hôte et la piqûre……..-43-
- La digestion du sang et la maturation ovarienne……..-44-
- La recherche du lieu de ponte et la ponte……..-44-
I-2-6- Faciès et strates épidémiologiques du paludisme……..-44-
I-3- Les moyens de lutte contre le paludisme……..-48-
I-3-1- Historique de la lutte antipaludique……..-48-
I-3-2- Les méthodes de lutte antipaludique……..-49-
I-3-2-1- La lutte contre le parasite……..-49-
Le diagnostic……..-50-
Le traitement……..-50-
La chimioprophylaxie……..-51-
Les stratégies vaccinales……..-51-
Vaccins anti-stades exo-érythrocytaires……..-52-
Vaccins anti-stades asexués (anti-mérozoïtes)……..-53-

Vaccins bloquant la transmission……-54-
Les antigènes variants de surface (AVS)……-54-
I-3-2-2- La lutte contre le vecteur……-55-
a- La lutte contre les larves……-55-
b- La lutte contre les adultes……-56-
b-1- *Réduction des densités de moustiques*……-56-
b-2- *Réduction du contact homme-vecteur*……-57-
Les moustiquaires imprégnées d'insecticide……-57-
Rideaux imprégnés……-59-
Autres méthodes de réduction du contact Homme-Vecteur……-59-
Les répulsifs……-60-
Les bombes aérosols……-60-
Les tortillons fumigènes……-60-
I-3-2-3- Le concept de lutte intégré……-60-

Chapitre II : *Méthodes d'évaluations actuelles de la lutte antipaludique et leurs limite*……-63-
II-1- Acceptabilité et surveillance des effets secondaires de la lutte……-64-
II-2- Evaluation entomologique de la lutte anti-vectorielle……-65-
II-2-1- Evaluation du risque d'exposition……-65-
Captures sur « appât humain »……-66-
Les pièges……-66-
Faune résiduelle……-67-
Limites des méthodes de captures……-67-
II-2-2- Evaluation du risque de transmission……-68-
II-2-3- L'analyse du repas sanguin……-69-
II-3- Evaluation de l'impact épidémiologique de la lutte……-70-
II-3-1- Critères cliniques……-70-
II-3-1-1- Indice splénique et indice de Hackett……-70-
II-3-1-2- La morbidité palustre……-70-
II-3-1-3- La mortalité palustre……-71-
II-3-2- Critères parasitologiques : les infections plasmodiales……-72-
a- La prévalence des infections plasmodiales……-72-

b- La densité des infections plasmodiales.....-73-
c- L'incidence des infections plasmodiales.....-74-
II-3-3- Analyses des données séro-épidémiologiques.....-74-
II-4- Approche environnementale intégrée.....-75-

Deuxième partie

Salive des Arthropodes : diversité, rôles et possibles applications.....-78-
Chapitre III : Salive des Arthropodes vecteurs : diversité et rôles pharmacologique et immunologique.....-79-
III-1- De la piqûre de l'arthropode à la réponse de l'homme.....-83-
III-1-1- Les pièces buccales.....-83-
III-1-2- La piqûre.....-85-
III-1-3- Réponses de l'homme à la piqûre.....-86-
III-1-3-1- La réponse hémostatique de l'hôte.....-86-
III-1-3-2- La réaction inflammatoire.....-89-
III-1-3-3- La réponse immune.....-90-
III-2- Propriétés pharmacologiques des protéines salivaires.....-93-
III-2-1- Inhibition de l'agrégation plaquettaire.....-94-
Apyrase.....-95-
Autres anti-agrégations plaquetaires.....-96-
III-2-2- Inhibition de la coagulation.....-97-
III-2-3- Vasodilatation.....-98-
- Catechol Oxidase/peroxidase.....-99-
- Peptides à action vasodilatrice.....-99-
- Oxyde nitrique (NO).....-99-
- Prostaglandines.....-100-
III-3- Inhibition de la réaction inflammatoire.....-100-
III-4- Propriétés immunologiques de la salive des arthropodes.....-101-
III-4-1- Modulation de la réponse immune de l'hôte par la salive des arthropodes.....-102-
III-4-2- Salive des arthropodes, transmission de pathogènes et développement de l'infection.....-107-

III-4-3- Salive des arthropodes et réponse immune anti-pathogène.....-109-
III-5- Autres rôles des protéines salivaires.....-110-
III-6- Etude du transcriptome/Sialome des glandes salivaires et leurs applications.....-111-
III-6-1- Techniques de l'étude du Sialotranscriptome des Arthropodes.....-111-
III-6-2- Description du sialome d'*Anopheles*.....-115-
a- Des protéines de la famille des D7.....-116-
b- Des protéines de la famille des antigènes (AG)-5.....-116-
c- Des protéines de la superfamille des Salivary Gland (SG).....-116-
d- Des mucines diverses.....-117-
e- Des enzymes.....-117-
f- Des produits relatifs à l'immunité.....-117-
III-6-3- Applications post-sialotranscriptomiques possibles.....-119-

Chapitre IV : *Etude de la relation immunologique Homme-Vecteur et applications potentielles*.....-120-
IV-1- Salive des arthropodes et vaccins anti-transmission.....-121-
IV-1-1- Effet de la pré-exposition aux antigènes salivaires.....-122-
IV-1-2- Approche vaccinale.....-123-
Chez l'animal.....-124-
Vers un vaccin pour l'homme ?.....-125-
IV-2- Salive des arthropodes et réaction allergiques chez l'hôte.....-127-
IV-3- Salive et marqueurs d'exposition aux piqûres des arthropodes vecteurs.....-128-

Troisième Partie

Travaux de thèse proprement dits.....-133-
Chapitre V : *Objectifs*.....-134-
V-1- Objectif général.....-135-
V-2- Objectifs spécifiques.....-135-
V-2-1- Evaluation de l'exposition et de l'efficacité de la LAV dans des contextes épidémiologiques différents.....-135-

V-2-2- Optimisation du peptide gSG6-P1 comme bio-marqueur salivaire……-136-

Chapitre VI :
Méthodes……-137-
VI-1- Etude « LAV-Angola »……-138-
VI-1-1- Zone d'étude……-139-
La localité de Lobito……-140-
VI-1-2- Population étudiée……-141-
VI-1-2-1- Enquêtes sur l'utilisation et l'entretien des MIIs……-142-
VI-1-2-2- Enquêtes et recueil de données entomologiques……-142-
VI-1-2-3- Prélèvements de gouttes épaisses de sang sur lames et sur papiers buvards…..-143-
VI-2- Etudes « Sénégal »……-144-
VI-2-1- Etude Pal-Fleuve (Paludisme dans la Région du Fleuve Sénégal)……-144-
VI-2-1-1- Zone d'étude……-145-
VI-2-1-2- Population d'étude……-146-
VI-2-2- Etude Actu-Palu (Région de Dakar)……-147-
VI-2-2-1- Zone d'étude……-148-
VI-2-2-2- Sélection des sites et population d'étude……-149-
VI-3- Etude « Bénin »……-152-
VI-3-1- Zone d'étude……-153-
VI-3-2- Population d'étude……-154-
VI-4- Analyses au laboratoire……-155-
VI-4-1- Production des antigènes utilisés……-155-
VI-4-1-1- Récolte de la salive……-155-
VI-4-1-2- Identification et obtention du peptide gSG6-P1……-156-
VI-4-2- Elution des gouttes épaisses de sang totale sur papier buvard……-159-
VI-4-3- Technique de dosages immunologiques par ELISA……-160-
Principe……-160-
Mode opératoire……-160-
VI-5- Analyses statistiques des résultats……-163-
Modèle linéaire mixte……-164-

Chapitre VII : *Vers un indicateur épidémiologique évaluant l'efficacité de la lutte anti-vectorielle*……-165-

VII-1- Validation du concept « salive totale » = marqueur d'exposition et outil d'efficacité LAV……-166-

VII-1-1- Suivis entomologique et parasitologique……-166-

VII-1-2- Résultats des enquêtes d'observance sur l'utilisation et la qualité des MIIs……-169-

VII-1-3- Evaluation de la réponse IgG anti-salive avant et après utilisation des MIIs……-170-

VII-1-4- Variations de la réponse IgG anti-salive en fonction de l'âge et du sexe……-174-

VII-1-4-1- Evolution de la réponse IgG anti-salive en fonction de l'âge des individus……-174-

VII-1-4-2- Evolution de la réponse IgG anti-salive en fonction du sexe des individus……-175-

VII-1-5- Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus……-175-

VII-2- Le peptide gSG6-P1: le candidat biomarqueur pour l'évaluation pertinente de l'efficacité de la LAV……-176-

VII-2-1- Réponses IgG anti-peptide gSG6-P1 avant et après utilisation des MIIs……-177-

VII-2-1-1- Détermination et évolution de la proportion d'individus répondeurs……-177-

VII-2-1-2- Réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles et évolution des réponses médiane…-180-

VII-2-1-3- Réponses IgG anti-gSG6-P1 et évaluation à court terme de l'efficacité individuelle des MIIs……-181-

VII-2-2- Variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge et du sexe……-182-

VII-2-2-1- Effet de l'âge sur la réponse IgG anti-gSG6-P1……-182-

VII-2-2-2- Effet du sexe sur la réponse IgG anti-gSG6-P1……-185-

VII-2-3- Comparaison des réponses IgG anti-salive totale *versus* IgG anti-gSG6-P1……-186-

En résumé……-189-

Chapitre VIII : *Le biomarqueur gSG6-P1 et évaluation de l'exposition et de diverses stratégies de lutte anti-vectorielle en zones de faible densité anophélienne*……-191-

VIII-1- LE gSG6-P1, un biomarqueur pour évaluer l'hétérogénéité de l'exposition aux piqûres d'anophèles en milieu urbain……-193-

VIII-1-1- Répartition de l'âge des enfants et des femmes……-193-

VIII-1-2- Peptide gSG6-P1 pour évaluer l'hétérogénéité de l'exposition et du risque de paludisme……-194-

VIII-1-2-1- Résultats de l'étude des réponses IgG anti-gSG6-P1……-194-

VIII-1-2-2- Réponses IgG anti-gSG6-P1 et agressivité d'*Anopheles gambiae*……-197-

a- Résultats des captures sur hommes……-198-

b- Proportions de répondeurs IgG et taux d'agressivité d'*An. gambiae*……-198-

c- Niveaux IgG anti-gSG6-P1 médians et taux d'agressivité d'*An. gambiae*……-200-

VIII-1-3- Le peptide gSG6-P1 : outil complémentaire pour évaluer l'exposition des populations urbaines aux anophèles vecteurs……-205-

VIII-2- Le gSG6-P1, un biomarqueur pour évaluer l'efficacité de diverses stratégies de la LAV en milieu urbain……-207-

VIII-2-1- Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans cette étude……-207-

VIII-2-2- Réponse IgG anti-gSG6-P1 pour l'évaluation de l'efficacité de l'utilisation des moustiquaires par les populations urbaines……-215-

VIII-2-2-1- Effet de l'âge……-215-

VIII-2-2-2- Utilisation de la moustiquaire et réponse IgG anti-gSG6-P1 dans la population totale……-216-

VIII-2-2-3- Utilisation de la moustiquaire et réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction des groupes d'exposition……-218-

En résumé……-223-

Chapitre IX : *Optimisation du biomarqueur gSG6-P1: indicateur d'exposition à An. funestus et utilisation chez les très jeunes enfants (< 1 an)*……-226-

IX-1- Peptide gSG6-P1: biomarqueur évaluant l'exposition à *An. Funestus…*-228-

IX-1-1- Résultats entomologiques et parasitologiques……-228-

IX-1-2- Résultats IgG anti-gSG6-P1……-229-

IX-2- Peptide gSG6-P1: biomarqueur évaluant l'exposition chez les très jeunes enfants et nouveau-nés……-230-

IX-2-1- Acquisition et évolution du taux d'IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants au cours des premiers mois de vie……-230-

IX-2-2- La transmission d'IgG anti-gSG-P1 de la mère à l'enfant……-231-

IX-2-3- Evolution comparée des taux d'IgG anti-gSG6-P1 des enfants forts et faibles répondeurs en M3……-234-

En résumé……-236-

Chapitre X : *Discussion générale*……-239-

X-1- Détection d'IgG spécifiques par ELISA sur des éluats de gouttes de sang total sur papier buvard……-240-

X-2- Réponse anticorps (IgG) anti-protéines salivaires comme Biomarqueur d'exposition……..-242-

Biomarqueur d'exposition à *Anopheles*……..-242-

Salive totale d'*An. gambiae* et gSG6-P1 pour l'évaluation de l'exposition individuelle……..-244-

Le peptide gSG6-P1 plus pertinent que la salive totale comme biomarqueur ?.....-245-

Le peptide gSG6-P1 plus sensible et pertinent que les méthodes entomologiques pour évaluer l'hétérogénéité de l'expositionaux faibles densités d'*Anopheles* ?.....-247-

Le peptide gSG6-P1 pour évaluer l'exposition aux autres anophèles vecteurs : l'exemple d'*An. funestus*……..-250-

X-3- Acquisition et facteurs de variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1….-251-

Acquisition de la réponse IgG anti-gSG6-P1……-251-

Facteurs de variations de la réponse anticorps IgG anti-gSG6-P1……-253-

X-4- Réponse IgG anti-protéines salivaires comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle……-255-

Evaluation directe de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIIs)……..-255-

Le gSG6-P1 pour évaluer indirectement l'efficacité de l'utilisation de divers moyens de lutte contre les anophèles en milieu urbain (région de Dakar)……-259-

X-5- Labilité des IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 : une propriété immunologique d'un biomarqueur ?……..-263-

Conclusions et perspectives……..-265-

Références bibliographiques……-275-

- Annexe 1 :

Liste des publications et communications personnelles

- Annexe 2 :

Article : **Drame PM**, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J,, Sow C, Dos-Santos MA, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. **2010**. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy of Insecticides Treated Nets in Malaria Vector Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 83 (1): 115-121.

- Annexe 3 :

Article: Poinsignon A, Samb B, Doucoure S, **Drame PM**, Sarr JB, Sow C, Cornelie S, Maiga S, Thiam C, Rogerie F, Guindo S, Hermann E, Simondon F, Dia I, Riveau G, Konate L and Remoue

F. A First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an imuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *An. funestus* bites. *Trop Med Int Health.* 2010 Oct;15(10):1198-203.

- Annexe 4 :

Article**: Drame PM**, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J,, Sow C, Dos-Santos MA, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. Human antibody response to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of Insecticide Treated Nets in malaria vector control. *PLoS ONE* 5(12): e15596

- Annexe 5 :

Article**: Dramé PM,** Machault V, Diallo A, Poinsignon A, Ndonky A, Cornelie S, Doucoure S, Dos-Santos S, Lalou R, Sembène M, Hesran J-Y, Pages F and Remoue F. Human IgG responses to a salivary peptide, gSG6-P1: an immuno-epidemiological tool for evaluating the exposure heterogeneity to *Anopheles* bites in Dakar region, Senegal. Soumis.

REMERCIEMENTS

Mes premières pensées durant la rédaction de ce document sont destinées aux spéciales personnes, sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour :

Je tiens à remercier particulièrement Franck REMOUE qui a co-dirigé cette thèse. Tu as bercé mes pas dans la recherche depuis le DEA où tu as mis à ma disposition une thématique originale et très intéressante. Tu as toujours su me soutenir, m'accompagner, m'encourager et répondre à mes multiples sollicitations, même dépassant le cadre professionnel, tout au long de ces 3 années de thèse. MERCI. Ta rigueur dans le travail, ta riche culture scientifique et les nombreuses expériences partagées (avec moi !) ont exacerbé ma motivation et m'ont permis de réaliser ce travail en toute sérénité, dans des conditions idéales. Merci aussi pour ta disponibilité, l'amour et le respect que tu portes à l'égard de tes étudiants (et à mon égard moi !!!) et qui font de toi une personne aux qualités humaines exceptionnelles, exemplaire et enviable. Sincèrement, il m'est impossible aujourd'hui de te remercier assez en quelques phrases. Alors, « DIEUREUDIEUF » tout simplement !!!

Je tiens à remercier sincèrement Mbacké SEMBÈNE que j'appelle affectueusement « Professeur » et qui a dirigé cette thèse. Je tiens à te manifester tout mon bonheur d'avoir pu bénéficié, durant ces 4 de DEA et de thèse, de ta rigueur et de ton humilité scientifiques qui ont été déterminantes pour la réalisation de ce travail. Je n'oublierai jamais les principes théoriques et pratiques souvent nombreuses et complexes de la biologie et la physiologie (que j'ai finies par aimer avec souplesse et bon goût !!!) que tu m'as enseigné, depuis la 2ème année de fac, tout au long de mon cursus universitaire. Merci pour toutes les richissimes connaissances scientifiques que tu nous as transmises avec amour et pédagogie. Tu m'as guidé et m'as vu grandir sous tes conseils. Conseils qui m'ont permis de réaliser un cursus universitaire sans embuches et qui me servent à cerner et à surmonter les aléas de la vie quotidienne. GRAND, merci beaucoup !!!

Ce travail a été mené au sein de 2 Unités de Recherche de l'IRD : au sein de l'UR024 « Epidémiologie et Prévention » jusqu'à la fin 2008 et puis au sein de l'UR016 « Contrôle et Caractérisation des Populations de Vecteurs » dirigées, respectivement, par François SIMONDON et Didier FONTENILLE que je tiens à remercier sincèrement. Merci pour avoir bien voulu m'accueillir dans vos Unités de Recherche et mettre à ma disposition toute la logistique nécessaire pour mener à bien ce travail. Je suis heureux de pouvoir vous exprimer toute ma reconnaissance !!!

Je remercie aussi Denis BOULANGER qui m'a accueilli comme stagiaire en DEA au sein de l'ex-UR 024. L'amour et le respect que tu portes aux autres forcent l'admiration. Tes pertinents remarques et conseils au cours de discussions fructueuses qu'on a eu à Dakar et à Montpellier ont contribué à la réalisation de ce travail. Sois assuré de mon estime !!!

Je tiens à remercier très sincèrement les membres du jury pour avoir accepté sans hésitation d'évaluer et de juger ce travail. Je suis convaincu que vos suggestions, remarques et critiques contribueront à l'amélioration de ce manuscrit. Soyez assurés de mon très grand respect et de ma profonde reconnaissance !!!
Pr. Ousmane FAYE et Dr. Babacar FAYE, spécialistes, respectivement en entomologie médicale et en parasitologie à l'UCAD. C'est un honneur de bénéficier de votre jugement expert sur ce travail !!!

Pr. Niama Diop SALL (qui préside ce jury), spécialiste en biologie/biochimie médicale. Merci pour avoir accepté de présider ce jury et d'examiner ce travail et m'avoir admis dans votre formation doctorale « Biologie et Pathologies Humaines ».
Pr Bhen Sikina TOGUEBAYE, éminent spécialiste en parasitologie qu'il enseigne à toute une génération d'étudiants dont je fais partie. Merci pour m'avoir admis dans la promotion 2006-2007 du DEA de Biologie Animale de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar et pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je ne saurais jamais oublier de remercier vivement et sincèrement :
Cheikh SOKHNA, épidémiologiste et paludologue de référence à l'IRD (UMR 198), pour m'avoir accueilli au sein de son groupe durant les derniers mois de cette thèse (à Dakar). Grand merci aussi pour avoir su répondre à mes multiples sollicitations et mettre à ma disposition toute la logistique nécessaire pour une fin de thèse en toute tranquillité. Sois assuré de mon estime et de toute ma reconnaissance !!!
Anne POINSIGNON. Tu as suivi et t'es beaucoup investie, depuis le DEA, dans chaque étape de mes travaux, de près (à Dakar et à Montpellier) comme de loin (en étant en Australie). En cela, je te suis extrêmement reconnaissant. Cela a été pour moi un grand plaisir de travailler avec toi. Donc je te dis « DIADIEUF » et « légui légui ». Inch Allah !!!
Jean-Marc HOUGARD qui a suivi depuis le début et continue à suivre avec intérêt ce projet de recherche.

Ce travail a été effectué en alternance entre le Sénégal, la France (Montpellier) et le Bénin. J'ai eu à travailler avec des personnes qui ont fait de mon expérience dans chacun de ces pays une aventure extraordinaire aussi bien sur le plan professionnel que social et humain.

Au Sénégal, je tiens à remercier tous mes excellents collègues ex-membres de l'ex-UR024 : Cheikh Saya SOW, Amady Ndiaye, Toffène NDIAYE, Céciles CAMES, Mamadou NGOM (Tonio), Abdoulaye NGOM. Merci pour votre soutien, vos conseils, votre amitié et pour tous les merveilleux moments passés ensemble dans une excellente ambiance de travail apprécié par tous et que je garderai toujours en mémoire.
Mes remerciements sénégalais sont aussi destinés aux membres de l'UMR 198, plus particulièrement Ousmane NDIATH, Abdoulaye GAYE, Libasse GADIAGA, Seynabou SOUGOUFARA, Thiané SARR, Thiané SARR, Madame BA, El-Hadji BA (Fatou MBAYE), Nafi DIAGNE, Georges DIATTA, Charles… Merci pour votre sympathie !!!

A Montpellier, je remercie très sincèrement les collègues du groupe « EPIVECT », membres de l'UR016 : Sylvie CORNELIE, François MOUCHET, Souleymane DOUCOURE et Marie SENGLAT-ROSSIGNOL sans qui le travail débuté à Dakar n'aurait jamais abouti. Merci pour votre amitié, votre précieuse aide et vos conseils précieux. Je n'oublie pas Jean Birame SARR, Françoise MATHIEU-DAUDE et Alexandra MARIE pour leur sympathie, convivialité et leurs encouragements. Alex, grand merci aussi pour la lecture du manuscrit de thèse !!!
Mes sincères remerciements montpelliérains sont aussi destinés aux autres collègues de l'UR016, plus particulièrement Fabrice CHANDRE, Nil RAHOLA, Valérie DELPLANCHE, Pierre KENGNE, Luc ABATTE, Sebastien MARCOMBE.
Grand merci à Sebastien PION (pour le foot et le vélo qui me manquent aussi !!!), Florie FILLOL, Amandine, Kirsten SIMONDON et Michel BOUSSINESQ de l'équipe « Nutrition » de l'UMR145.

A Cotonou (une ville qui m'a adoptée et que j'ai finie par apprécier !!!), je tiens à remercier tout d'abord le Pr. Martin AKOGBETO pour m'avoir accueilli au sein du CREC. Je remercie particulièrement Vincent CORBEL, Thierry BALDET et Marie-Claire HENRY pour m'avoir bien accueilli, leur sympathie et les nombreux échanges scientifiques eu avec eux et qui m'ont élucidé sur

un grand nombre de points. Je n'oublie pas mes collègues de l'IRD-CREC : Armel DJENONTIN (ex « compagnon d'infortune »), Abdoul Sahabi BIO-BANGANA, Nicolas MOIROUX, Emmanuel ELANGA, Cedric PENNETIER, Felix ZOUMENOU, Olayidé BOUSSARI, Innoncent DJEGBE, Sandra YAMADJAKO, Georgia DAMIEN, Ibrahim et Aboubacar SIDICK, Herbert NOUKPO, Lin ATIGLI, Narcisse HOUNAR, Jean, Cyril et Etiène. Je n'oublierai jamais toute l'aide que vous m'avez apporté et les merveilleux moments passés ensemble. Pour ce, je vous dis MERCI et au plaisir de vous revoir !!!

Je remercie également les personnes avec qui j'ai pu collaborer et qui m'ont permis de mener à bien l'ensemble de ces travaux. Je pense notamment à Dr. Pierre CARNEVALE, que je remercie chaleureusement, à Dr. Patrick BESNARD, Dr. Jacques LEMIRE et toute l'équipe MCP de la clinique SONAMET de Lobito (Angola), à Dr. Filomeno FORTES du PNLP Angola (Luanda), à Jean-Claude TOTO et Vincent FOUMANE de l'OCEAC de Yaoundé (Cameroun) qui ont permis la réalisation de l'étude Angola. Un grand merci à nos collègues de l'UMR246 (ex-UR010) : particulièrement à Dr. Jean-Yves LEHESRAN, Dr. Abdoulaye DIALLO, Dr. André GARCIA, Dr. David COURTIN, Dr. Giles COTTREL et Dr. Nadine FIEVET.

Mes sincères remerciements sont adressés à Madame Fama DIOP de l'École Doctorale SEV de l'UCAD de Dakar. Merci beaucoup pour votre précieuse aide dans les démarches administratives relatives à la soutenance. Soyez assurée de toute ma reconnaissance. Merci aussi à tous mes camarades de l'ED-SEV, plus particulièrement de la formation « Biologie et Pathologies Humaines »

Une série de pensées particulières est destinée à ma famille : mon beau-père, mes oncles, tantes, frères et sœurs, cousins et cousines, mon neveu Moustapha et ma nièce Abibatou (je vous adore !!!). Merci pour le soutien sans faille et de tout genre que vous m'apportez depuis mon enfance, même dans les moments les plus difficiles. Merci beaucoup à Nafissatou SY, mon exemplaire grande sœur adoptive et que j'admire (toi-même tu sais !!!).

A mes amis, Cheikh LO (« mon frère »), Souleymane DOUCOURE (le Julio !!!), Nathalie DIAGNE (ex-binôme de choc), Denis DACOSTA, Babacar LOUM, Khadim KEBE, Assa BALAYARA, Moussa THIAM, Fatou NDOYE (Diaga), Mame Sokhna SARR, Anta AGNE, Malick NDOYE, Fati Cor SECK, Ndeye Thiama DIOUF, Déthié SARR, Gabriela SKULOVA, Omar SARR, Oumar BA, Binta LOME… Merci pour votre amitié et pour tous ces merveilleux moments que nous continuons de passer ensemble.

Mes dernières pensées appartiennent à mon défunt père et ma mère. Mère, merci pour ta patience. YAYE FATOU, merci d'être là !!!

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des zones d'endémie d'après Metselaar & Van Thiel……-45-

Tableau 2. Date et nombre d'échantillonnages entomologiques dans les sites communs aux études Actu-Palu et Entomo-Dakar……-152-

Tableau 3. Situation générale de la faune culicidienne dans les habitations étudiées……-167-

Tableau 4. Résultats des enquêtes d'observance de la qualité et l'utilisation des MIIs…..-169-

Tableau 5. Nombre et pourcentage de répondeurs des 105 individus suivant les mois….-178-

Tableau 6. Age moyen des enfants et adultes dans chacun des 16 quartiers……-194-

Tableau 7. Proportions de répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 des enfants, des femmes, seuls ou réunis, de chacun 16 quartiers……-196-

Tableau 8. Constitution des groupes d'exposition en se basant sur la réponse IgG anti-gSG6-P1……-205-

Tableau 9. Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes des 45 quartiers de l'étude Actu-Palu 2008……-209-

Tableau 10. Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 1……-211-

Tableau 11. Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 2……-212-

Tableau 12. Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 3……-213-

Tableau 13. Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 4……-214-

Tableau 14. Biomarqueurs : les apports de la thèse……-272-

Liste des figures

Figure 1. Répartition des zones impaludées dans le monde ……-19-

Figure 2. Répartition des zones impaludées en Afrique……-20-

Figure 3. Prévalence de la morbidité palustre en fonction des régions au Sénégal (2007)..-22-

Figure 4. Cycle du développement des *Plasmodium spp*……-24-

Figure 5. Recherche de *Plasmodium spp*. par la technique du QCB® Malaria……-30-

Figure 6. Recherche d'antigènes circulant de *P. falciparum*……-31-

Figure 7. Adhésion des hématies infectées par *P. falciparum* aux autres cellules de l'hôte humain (la cytoadhérence)……-36-

Figure 8. Distribution globale des vecteurs principaux et secondaires du paludisme dans le monde……-38-

Figure 9. *An. gambiae* et *An. funestus* lors d'une prise de repas sanguin……-39-

Figure 10. Géo-distribution des vecteurs *An. gambiae s. l*……-40-

Figure 11. Géo-distribution du vecteurs *An. funestus*……-40-

Figure 12. Cycle biologique d'un anophèle……-41-

Figure 13. Exemple de gîtes larvaires d'anophèles……-42-

Figure 14. Faciès épidémiologique du paludisme dans la région Afrotropicale……-46-

Figure 15. Représentation schématique des antigènes candidats vaccins……-52-

Figure 16. Un homme en train d'installer une moustiquaire au dessus de son lit……-58-

Figure 17. Charte décisionnelle pour le monitoring de la lutte intégrée contre le paludisme ……-62-

Figure 18. Cycle du parasite……-80-

Figure 19. Représentation schématique des glandes salivaires d'un anophèle adulte……-82-

Figure 20. Pièces buccales d'une femelle d'anophèle……-84-

Figure 21. Mécanismes d'activation et d'agrégation plaquettaire……-87-

Figure 22. Cascade de coagulation du sang chez l'Homme……-88-

Figure 23. Inflammation, dépendante des mastocytes, de la peau de souris induite par la piqûre d'*An. stephensi*……-89-

Figure 24. Réponses immunes de l'hôte contre la salive des arthropodes hématophages..-91-

Figure 25. Hématophagie et inhibition de la réaction hémostatique de l'hôte par la salive du vecteur : diversité des molécules salivaires anti-hémostase……-94-

Figure 26. Inhibition de l'agrégation plaquettaire par la salive des arthropodes hématophage……-95-

Figure 27. Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur la cascade de coagulation……-97-

Figure 28. Modification des réponses immunes innée et adaptative par la salive des arthropodes hématophages……-102-

Figure 29. Protocoles (A) et stratégies (B) utilisés pour isoler et caractériser les protéines ou les ADNc salivaires des insectes vecteurs……..-112-

Figure 30. Analyse protéomique des glandes salivaires d'*An. gambiae* par électrophorèse (gel 1D) et par séquençage d'Edman……..-113-

Figure 31. Analyse protéomique des glandes salivaires d'*An. gambiae* par électrophorèse (gel 2D)……-113-

Figure 32. Analyse bio-informatique de séquences (5' EST) issues d'une banque d'ADNc des glandes salivaires d'*An. gambiae*……-114-

Figure 33. Répartition des protéines des glandes salivaires d'*An. gambiae* en fonction de leur fonction biologique (A) et de leur localisation cellulaire (B)……-117-

Figure 34. Faciès épidémiologiques du paludisme en Angola selon la classification de J. Mouchet et Coll. 1994……-140-

Figure 35. Diagramme de suivis de l'étude LAV/Angola……-141-

Figure 36. Localisation du village de Gankette Balla……-145-

Figure 37. Distribution temporelle des précipitations enregistrées dans la région de Dakar durant l'hivernage 2008……-148-

Figure 38. Représentation des 50 sites d'étude (Actu-Palu 2008) sur la carte de la région de Dakar……-150-

Figure 39. Carte de la république du Bénin montrant la zone d'étude……-154-

Figure 40. Technique de Salivation de moustiques au laboratoire……-156-

Figure 41. Alignements des séquences de gSG6 chez 3 espèces d'*Anopheles*, *An. stephensi* (AS), *An. funestus* (AF) et *An. gambiae* (AG)……-157-

Figure 42. Stratégies permettant l'identification de candidats salivaires pour l'élaboration de marqueur d'exposition……-158-

Figure 43. Séquence d'acides aminés des 5 peptides sélectionnés de la protéine gSG6….-158-

Figure 44. Prélèvements de gouttes de sang total sur buvard……-159-

Figure 45. Etapes du dosage d'Ac anti-protéines salivaires par la technique ELISA……-162-

Figure 46. Evolution de la parasitémie et des données entomologiques……-168-

Figure 47. Réponse IgG anti-salive avant et après utilisation des MIIs et parasitémie…….-171-

Figure 48. Niveaux individuels de réponse Ac IgG anti-salive totale avant et après utilisation des MIIs……-173-

Figure 49. Evolution des réponses IgG anti-salive en fonction de l'âge……-174-

Figure 50. Réponse IgG anti-salive totale chez les 109 individus infectés ou non……-175-

Figure 51. Comparaisons entre le pourcentage de répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et les données entomologiques et parasitologiques……-179-

Figure 52. Niveaux d'Ac IgG anti-gSG6-P1 avant et après utilisation des MIIs……..-180-

Figure 53. Réponse IgG anti-gSG6-P1 pour évaluer l'efficacité à court terme de l'utilisation individuelle des MIIs……-182-

Figure 54. Evolution des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge……-183-

Figure 55. Réponses IgG anti-gSG6-P1 pour évaluer l'efficacité des MIIs en fonction de l'âge des individus……-184-

Figure 56. Effet des MIIs sur la baisse des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge……..-185-

Figure 57. Evolution des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction du sexe……..-186-

Figure 58. Evolution comparée des réponses IgG anti-salive totale et anti-gSG6-P1 avant et après MIIs……-187-

Figure 59. Réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles et médianes dans 16 quartiers de la région de Dakar……-195-

Figure 60. Corrélation entre la proportion d'individus (femmes et enfants) répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……-199-

Figure 61. Corrélation entre la proportion d'enfants répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……-199-

Figure 62. Corrélation entre la proportion de femmes répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……-200-

Figure 63. Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les femmes et enfants et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……-201-

Figure 64. Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les enfants et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……-202-

Figure 65. Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les femmes et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar……..-202-

Figure 66. Taux d'utilisation de la moustiquaire dans chacun des 16 quartiers……-203-

Figure 67. Comparaison des moyennes de pourcentages de répondeurs, de médianes de réponses IgG et des taux d'agressivité moyens entre les 3 groupes « IgG anti-gSG6-P1 ».-206-

Figure 68. Niveaux IgG anti-gSG6-P1 en fonction de la catégorie et la classe d'âge……-216-

Figure 69. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans la population générale……..-217-

Figure 70. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes de l'étude Actu-Palu 2008……-217-

Figure 71. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction du groupe d'exposition (1)……..-219-

Figure 72. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction du groupe d'exposition (2)……..-220-

Figure 73. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes dans chaque groupe d'exposition……-221-

Figure 74. Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge des enfants dans chaque groupe d'exposition……..-222-

Figure 75. Evolution des taux d'agressivité d'*An. funestus* et de prévalence moyenne des infections à *P. falciparum* entre juin et décembre 2004 dans le village de Gankett Balla..-228-

Figure 76. Evolution de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les 173 enfants du village de Gankette Balla entre juin et décembre 2004……..-229-

Figure 77. Evolution du taux d'IgG chez enfants au cours de la première année de vie…..-231-

Figure 78. Transmission probable d'IgG anti-gSG6-P1 de la maman à l'enfant……..-232-

Figure 79. Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 des mamans (CI) et du cordon ombilical des enfants (CO)……-232-

Figure 80. Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 du sang du CO et des enfants en M3…….-233-

Figure 81. Comparaison du taux d'IgG du sang du cordon ombilical entre les enfants forts répondeurs et les faibles répondeurs en M3.....-233-

Figure 82. Comparaison du taux d'IgG anti-gSG6-P1 à 6 (A), 9 (B) et 12 (C) mois entre les enfants forts et faibles répondeurs à 3 mois (en M3)……..-234-

Figure 83. Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 des enfants en M3 et M6 (A), M9 (B) et M12 (C)…….-235-

Cadre des travaux de thèse

Laboratoires d'accueil:

Ces présents travaux ont été menés dans le cadre d'une thèse scientifique de la Formation Doctorale « Biologie et Pathologies Humaines » de l'Ecole Doctorale « Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement » de l'Université Cheikh Anta DIOP (UCAD) de Dakar. Cette thèse constitue une contribution à la recherche de nouveaux biomarqueurs évaluant l'exposition des populations humaines aux vecteurs de maladies tropicales infectieuses et permettant de mesurer l'efficacité de différentes stratégies de lutte utilisées contre ces vecteurs. Elle a été réalisée en alternance entre le Sénégal, la France et le Bénin (1 an dans chaque pays), grâce à une allocation de recherche du Département de Soutien et Formation (DSF) de l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD), et sous la co-direction des Drs. Mbacké Sembène (Directeur de thèse, Faculté des Sciences et Techniques, UCAD) et Franck Remoué (Co-directeur, IRD).

Cette thèse a été réalisée au sein du Projet EPIVECT (Epidémiologie des Vecteurs), programme initié il y a 8 ans sous la direction des Drs. Franck Remoué et François Simondon, développé dans l'unité UR024 « Epidémiologie et Prévention » jusqu'à la fin de l'année 2008, puis au sein de l'UR016 « Contrôle et Caractérisation des Populations Vecteurs » de l'IRD en 2009 et 2010. Le thème principal du projet EPIVECT concerne l'étude des relations Homme-Vecteur au cours des maladies transmises par des vecteurs arthropodes. Un de ses objectifs majeurs est d'identifier des biomarqueurs immuno-épidémiologiques d'exposition à la piqûre du vecteur et ainsi d'élaborer un indicateur évaluant le risque des individus aux maladies à transmission vectorielle et un nouvel outil d'évaluation de la lutte anti-vectorielle (LAV). Quatre thèmes sont développés dans ce projet EPIVECT :

- Thème n°1 : **Exp-Anopheles** = Marqueur d'exposition à *Anopheles*: applications à la lutte antivectorielle (LAV) et aux faibles intensités d'exposition. Terrain : Bénin, Sénégal, Angola. Ce thème correspond à celui des travaux développés dans cette thèse.
- Thème n°2 : **Exp-Aedes** = Identification et validation d'un marqueur d'exposition à *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus.* Terrain : Réunion, Comores, Bolivie, Cameroun.
- Thème n°3 : **ImmunoModul** = Influence des piqûres (salive) d'*Anopheles* sur la réponse immune anti-Plasmodium. Terrain : Sénégal.
- Thème n°4 : **EntomoMark** = Étude de l'expression des protéines salivaires d'*Anopheles* : un nouvel outil entomologique pour l'étude des vecteurs, de leur comportement et des interactions vecteur-pathogène ? Terrain : Bénin, Cameroun.

Les laboratoires du projet EpiVect au sein desquels ce travail de thèse a été développé sont implantés à la fois :

- A Dakar (Campus international UCAD-IRD de Hann, Sénégal) pour la 1ère année (novembre 2007–décembre 2008) durant laquelle les analyses de laboratoire et statistiques des études « salive totale » et « gSG6-P1 » Angola ont été menées.
- A Montpellier au laboratoire de l'UR0156 (Centre IRD de Montpellier, France) pour la 2nde année (janvier 2009–octobre 2009) au cours de laquelle les analyses de laboratoire et statistiques des études Actu-Palu et Tori-Bossito ont été faites.
- A Cotonou (IRD-Centre de Recherche en Entomologie de Cotonou, Bénin) pour la 3ème année de cette thèse (novembre 2009–octobre 2010) pour la valorisation des travaux (rédaction et publication d'articles scientifiques), le transfert de technologies et la rédaction du mémoire de thèse et la participation au terrain de l'étude REFS (suivi longitudinale de phase 3) au Sud Bénin pour la recherche de nouvelles méthodes de lutte anti-vectorielle. Cette étude REFS constitue une suite logique de ces travaux de thèse.

Cette thèse multidisciplinaire, combinant l'immunologie, l'épidémiologie, l'entomologie et la parasitologie, avait comme objectif principal d'évaluer, chez l'Homme, si la réponse anticorps contre des protéines salivaires comme un biomarqueur immunologique pourrait permettre d'estimer **(i)** le niveau d'exposition des individus et des populations aux piqûres et donc le risque de paludisme et **(ii)** l'efficacité des moyens de lutte contre ces vecteurs du paludisme.

Collaborations principales:

Ce projet de thèse n'aurait pu aboutir sans le succès d'étroites collaborations qui ont été menées avec les partenaires du Sud et différentes unités (Sud et Nord) de l'IRD.

Des collaborations sont toujours menées avec le Dr Lassana KONATE, responsable du laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire de l'UCAD, dans le cadre de l'étude PAL-Fleuve, et avec le Dr Mbacké SEMBENE, directeur de la formation doctorale « Génétique des Populations » de l'Ecole Doctorale « Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement » de l'UCAD. Des collaborations ont été aussi menées avec le Dr I. DIA de l'Institut Pasteur de Dakar pour le volet entomologique de l'étude PAL-Fleuve.

Des collaborations ont aussi été menées avec notamment les Drs. P CARNEVALE (IRD-UR016), P. BESNARD (Medecin-chef Clinique Sonamet de LOBITO, Angola), J-C TOTO et V. FOUMANE (OCEAC Yaoundé) et F. FORTES (PNLP et Ministère de la Santé Publique,

Luanda- Angola), permettant ainsi, en toute pluridisciplinarité, la réalisation de l'étude « LAV/Angola » dans cette thèse.

Les autres études de cette thèse n'auraient pu être réalisées sans la collaboration obligatoire des équipes de l'IRD-UR010 (André GARCIA, David COURTIN, Michel COT et Jean-Yves LEHESRAN) pour les parties parasito-clinique et épidémiologique des études Tossi-Bossito/Bénin et Actu-Palu/Dakar.

La stratégie « peptide » de la protéine recombinante gSG6 ont été obtenus grâce à une série de collaborations menées avec José RIBEIRO (NIH, USA) et Bruno ARCA (Université de Naples, Italie).

Une collaboration étroite pour la partie épidémiologique du paludisme au Sénégal a été menée avec le Dr. Cheikh SOKHNA (UR077, IRD de Dakar) qui a assuré une partie de l'encadrement de ces travaux de thèse.

Le projet EPIVECT, pour lequel cette thèse constitue un axe, présente également de nombreuses collaborations (hors projet de thèse présenté ici) : IMTSSA (C. ROGIER, Pharo, Marseille), Institut Pasteur (V. CHOUMET, C. BOURGHOIN, Paris), IRD-UR177 (B. BUCHETON, Bobo-Dioulasso, Burkina-Fasso), MRTC (C. TRAORE, Bamako, Mali), CREC (M. AKOGBETO, Cotonou, Bénin), ARS (Ile de la Réunion, Mayotte).

Financements:

Ce travail a été mené à bien avec le soutien financier de SONAMET-Angola et Acergy-France, de la Délégation Générale de l'Armement du Ministère de la Défense français (n° REI DGA 05.34.038), de l'Agence National de la Recherche (ANR), de CGG-Veritas, du Département Expertise et Valorisation (DEV) de l'IRD (n°C4VPRFR2) et du Département de Soutien et Formation (DSF) des communautés du SUD de l'IRD qui m'a alloué une bourse de 31 mois dans le cadre de cette thèse.

INTRODUCTION

Les Arthropodes tiennent dans la vie des hommes et du bétail une place considérable par les rôles multiples d'alliés ou d'ennemis qu'ils jouent, dans tous les milieux et écosystèmes, naturels ou anthropisés. Des générations d'entomologistes ont consacré leurs travaux, tant en zones tempérées qu'en zones tropicales, aux vecteurs mécaniques ou biologiques que sont des milliers d'espèces d'insectes (moustiques, glossines, phlébotomes, puces, tiques, réduves…) vis-à-vis de parasites, virus, bactéries, engendrant des maladies graves humaines et animales (Rodhain and Perez, 1985). Parmi ces maladies à transmission vectorielle, le paludisme (une érythrocypathie : maladie des érythrocytes) demeure la plus grande endémie parasitaire mondiale (Collins and Paskewitz, 1995), un peu plus d'un siècle après la découverte par Ross (entre 1895 et 1898) du rôle vecteur des moustiques Diptères dans la transmission d'Hématozoaires du genre *Plasmodium* (agents pathogènes des paludismes).

Le paludisme touche plus d'une centaine de pays des régions tropicales et intertropicales de l'Asie, de l'Amérique du Sud et de l'Afrique. Il joue un rôle majeur dans le faible développement économique de certaines de ces régions endémiques où sa transmission est très intense (Snow *et al.*, 2005). De plus, le paludisme urbain est devenu une réalité dans la plupart des villes de ces régions, surtout dans celles grandissantes de l'Afrique subsaharienne (Robert *et al.*, 2003), et problématique du fait qu'environ 54% de la population africaine habiteront les villes en 2030 (Hay *et al.*, 2005).

Face à ce fléau, les hommes, depuis l'antiquité, essayent de développer des remèdes efficaces en proposant des moyens allant du plus « farfelu » au plus pertinent. De nombreuses stratégies de lutte ont ainsi été mises en place : elles reposent à la fois sur la stérilisation du réservoir humain (diminution du nombre de porteurs de gamétocytes), par des mesures préventives et chimiothérapeutiques, et sur la lutte anti-vectorielle (diminution des populations de vecteurs, essentiellement par l'utilisation d'insecticides). Cependant, la prévalence du paludisme se maintient toujours et une augmentation de son incidence est aujourd'hui observée dans certaines régions endémiques, malgré ces énormes efforts de lutte consentis (Greenwood *et al.*, 2008). Ceci est mis sous le compte des limites d'efficacité de chacune des méthodes actuelles de lutte, du fait de problèmes socio-économiques et culturelles, de l'apparition et de la rapide diffusion des résistances des parasites aux médicaments et des anophèles vecteurs aux insecticides et de l'attente d'un vaccin qui n'est toujours pas disponible malgré la pléthore d'antigènes candidats vaccins (Greenwood *et al.*, 2005; Greenwood *et al.*, 2008; Hemingway *et al.*, 2002; Phillips, 2001).

Néanmoins la lutte anti-vectorielle, surtout l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIIs), reste aujourd'hui l'une des principales méthodes de prévention de masse

applicable efficacement contre le paludisme (Greenwood *et al.*, 2005; Lengeler, 2004a). L'efficacité des MIIs dans la réduction de la morbidité et de la mortalité palustres est bien connue (Lengeler, 2000; 2004b) et des efforts de distributions massives, en phase avec les recommandations de l'OMS (WHO, 2005), ont été entrepris dans de nombreux pays endémiques (Eisele *et al.*, 2006; Grabowsky *et al.*, 2005a; Grabowsky *et al.*, 2005b; Guyatt *et al.*, 2002; Thwing *et al.*, 2008).

Actuellement, l'évaluation de l'impact de l'utilisation des MIIs, et des autres moyens de lutte contre les vecteurs en général, est basée sur des méthodes entomologiques (évaluation de l'exposition aux piqûres : captures par pièges, appât humain…, du taux d'inoculation entomologique ou TIE) et parasito-cliniques (prévalence et densités parasitaires, incidence de la maladie…). Mais ces méthodes de référence présentent des limites de sensibilité et, fréquemment, des biais (Smith *et al.*, 2004), surtout en zones d'exposition et transmission faibles voire modérées (Poinsignon *et al.*, 2009) ; zones qui deviennent très fréquentes suite à la mise en place de plus en plus active de programmes de lutte anti-vectorielle (LAV) par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme (PNLP) (Noor *et al.*, 2009).

L'application à large échelle de ces méthodes de référence est souvent coûteuse et confrontée à des questions éthiques. De plus, les deux principaux indicateurs utilisés pour le monitoring et la surveillance des stratégies basées sur les MIIs, les proportions de concessions possédant des MIIs et de populations vulnérables ou non dormant sous MIIs (Vanden Eng *et al.*, 2010), ne permettent pas de garantir leur réelle utilisation par les personnes concernées. Il apparaît ainsi nécessaire et urgent, non seulement d'améliorer les outils actuels et de développer de nouveaux moyens de lutte, mais également de mettre en place de plus pertinents indicateurs pour évaluer l'efficacité réelle de la lutte pour un meilleur contrôle de cette maladie.

L'amélioration des stratégies actuelles et le développement de nouveaux moyens efficaces de lutte doivent prendre en considération que les relations entre le parasite et ses 2 hôtes respectifs (l'Homme et le Vecteur) forment un réseau d'actions/réactions intégrant les trois protagonistes : parasite, vecteur et homme. Contrairement à celles entre le parasite et ses 2 hôtes, la relation Homme-Vecteur (relation entre les 2 hôtes du parasite) reste la moins étudiée bien que son importance fût soulignée dès la découverte du rôle du moustique dans la transmission du paludisme (Gordon and Crewe, 1948).

Les plasmodiums sont injectés à l'Homme, au cours d'un repas sanguin, avec les secrétions de la salive des insectes vecteurs. Certaines protéines de cette salive, par leurs propriétés pharmacologiques et immunologiques, sont indispensables au bon déroulement du

repas de sang du vecteur (Ribeiro *et al.*, 1985a; Ribeiro *et al.*, 1984a). L'étude de ces protéines salivaires permettrait de mieux comprendre la relation Homme-Vecteur et pourrait aboutir au développement de nouvelles stratégies de lutte (vaccins, allergies,…) et à l'amélioration des stratégies existant (marqueur d'exposition, indicateurs d'efficacités de la lutte). De plus, l'étude et la compréhension de leurs propriétés immunologiques peut permettre l'élaboration de biomarqueurs d'exposition aux piqûres des insectes vecteurs, et donc au risque de transmission des pathogènes (Remoue *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 1990). Cet axe de recherche constitue la principale thématique du projet EPIVECT (Epidémiologie des Vecteurs) qui a accueilli cette thèse.

Les travaux présentés dans cette thèse s'inscrivent directement dans le contexte du développement de nouveaux outils immuno-épidémiologiques, complémentaires aux méthodes entomologiques et parasito-cliniques de référence, permettant d'évaluer l'exposition individuelle aux piqûres des anophèles et de développer des outils mesurant l'efficacité réelle des stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme, quel que soit le contexte épidémiologique d'exposition et de transmission.

Nous présenterons, d'abord, la situation épidémiologique du paludisme dans le monde et en Afrique, les stratégies actuelles de lutte et leurs limites d'efficacité et les méthodes actuelles d'évaluation de l'exposition aux piqûres des moustiques vecteurs et de la LAV. Ensuite, nous ferons l'état des connaissances déjà acquises dans le domaine des protéines salivaires (identité, fonctions, propriétés) des arthropodes vecteurs et leurs applications possibles. Enfin, nous présenterons notre travail de thèse qui s'articule autour de 2 axes complémentaires : **1)** la validation et les applications potentielles de biomarqueurs salivaires permettant d'apprécier le niveau d'exposition des populations humaines aux piqûres et **2)** l'efficacité et la surveillance de l'utilisation des outils de lutte contre les anophèles vecteurs.

Notre premier objectif était de valider le concept « réponse anticorps anti-salive d'*Anopheles* » comme indicateur d'efficacité de l'utilisation des MIIs. Le deuxième objectif était de valider une protéine salivaire spécifique du genre *Anopheles* comme critère d'efficacité des diverses stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme. Enfin le troisième objectif était d'optimiser ce biomarqueur en l'appliquant dans des contextes épidémiologiques différents.

PREMIERE PARTIE

LE PALUDISME

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LE PALUDISME

I-1- Historique

Le paludisme, maladie parasitaire, sévissait déjà avant l'apparition de l'Homme. Les protozoaires du genre *Plasmodium* responsables sont des parasites très anciens de batraciens, de reptiles, d'oiseaux et de mammifères. Les agents responsables du paludisme humain seraient d'origine africaine et auraient co-évolué depuis plusieurs milliers d'années avec les Anthropoïdes africains, puis avec les Hommes. En Egypte, en 1600 avant Jésus Christ (J.C.), l'association frissons-fièvre et splénomégalie sur des papyrus et la concordance entre les crues du Nil et l'apparition des fièvres intermittentes ont été décrites. Au IVème siècle avant J.C., Hippocrate a réalisé les premières descriptions cliniques des fièvres palustres avec la triade classique « frissons-fièvre-sueur » selon des séquences quotidiennes, tierces (tous les 3 jours) ou quartes (tous les 4 jours).

Au IIème siècle avant J.C., les grecs et les romains ont relevé une corrélation étiologique entre les fièvres intermittentes et la proximité des marécages. Le terme italien « mal aria » ou mauvais air traduit bien la liaison faite par les italiens entre les fièvres et les miasmes véhiculés dans l'air. En 1717, Lancisi suggèrait que le paludisme était dû à un poison des marais transmis par des moustiques qui inoculent « les mauvaises humeurs dans le sang ».

A la fin du XIXème siècle, le médecin militaire français Alphonse Laveran fut le premier à démontrer la nature parasitaire de l'affection en détectant « des éléments pigmentés dans les globules rouges des malades atteints de fièvres palustres, qui se présentent sous forme de croissant, de sphères, de flagelles » et appella *Oscillaria malariae* (1881) le parasite responsable. Le terme francophone « paludisme », introduit par Laveran (1893), traduit la liaison « fièvres-marais » (palud = marais). En Italie, les travaux de Golgi (1889), de Grassi et Faletti (1892) sur *Plasmodium vivax et P. malariae*, et de Welch (1897), Marchiafava, Celli (1885) et de Faletti, Grassi (1892) sur *P. falciparum* confirmèrent l'origine parasitaire et l'identité spécifique des parasites. Aux Etats-Unis, Mac Callum (1898) montra l'origine des formes sanguines chez *P. falciparum* avec la formation de microgamètes, puis examina la fécondation donnant un « ookinète ». Entre 1895 et 1898, Ross montra que le paludisme pouvait être transmis par les moustiques. Grassi, Bastianelli et Bignami (1899) décrivirent le cycle complet de développement *de P. falciparum, P. vivax et P. malaria* chez *Anopheles claviger*.

I-2- Epidémiologie du Paludisme

I-2-1- Importance médicale du paludisme

Dans le monde :

Un des rares fléaux de santé publique qui ait traversé les siècles sans jamais perdre son activité, le paludisme est endémique dans 109 pays (**Figure 1**) des régions tropicales et intertropicales d'Amérique du Sud, d'Asie et majoritairement d'Afrique (45 des 53 pays africains) (WHO, 2008) où les conditions climatiques sont particulièrement favorables au développement des moustiques *Anopheles* vecteurs et des *Plasmodium* humains (Hay *et al.*, 2009; Hay *et al.*, 2004). Sur 3,3 milliards de personnes à risque (environ 50% de la population mondiale), on estime à 247 millions le nombre de cas annuels de paludisme, dont environ 881 milles cas mortels (WHO, 2008). La plupart de ces cas mortels (85%) surviennent chez les enfants de moins de cinq ans (WHO, 2008) qui, avec les femmes enceintes (23 millions de grossesses sont menacées chaque année), payent alors le plus lourd tribut à cette maladie (WHO-Unicef, 2003)

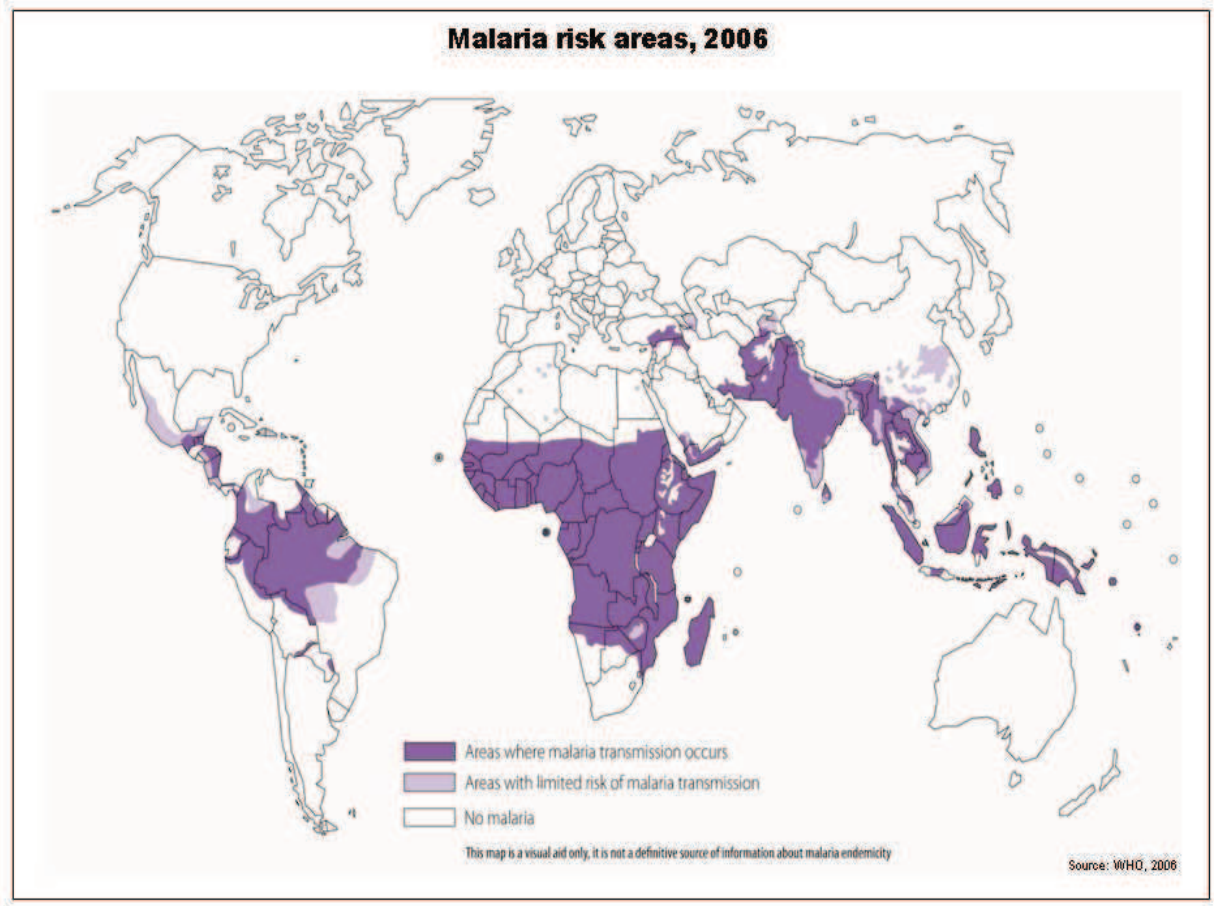
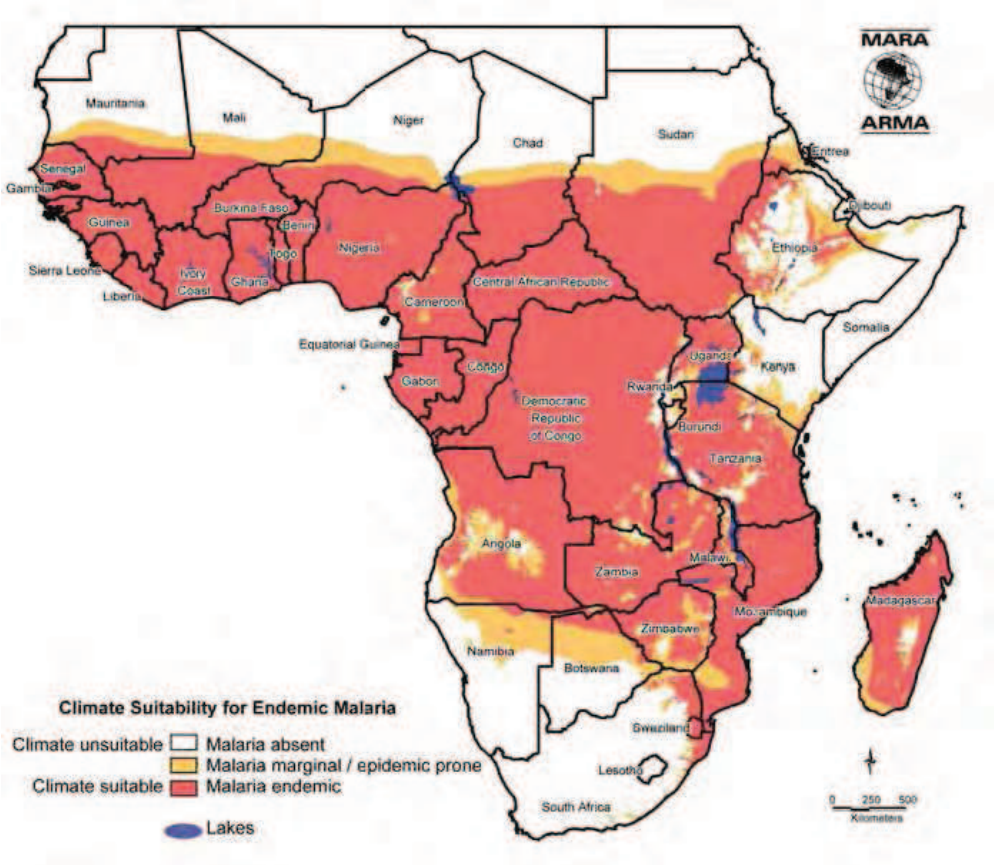


Figure 1 : Répartition des zones impaludées dans le monde d'après l'OMS en 2008

En Afrique :

Quatre vingt et onze pour cent (91%) des cas annuels de décès (environ 801000 cas) sont enregistrés en Afrique sub-saharienne (**Figure 2**) où 212 millions de cas annuels sont enregistrés (WHO, 2008). *P. falciparum,* l'espèce la plus fréquente et la plus dangereuse entraînant chaque année 2 à 3 millions de formes graves (Greenwood *et al.*, 2005; Greenwood *et al.*, 2008), avec la survenue d'accès cérébraux et d'anémies sévères surtout chez les enfants de moins de 5 ans et les femmes enceintes, est responsable de 80 à 95% des infections palustres annuelles (WHO, 1996) chez près de 610 millions d'Africains exposés (Guerra *et al.*, 2008). Le paludisme, en occasionnant un déficit de poids à la naissance, est aussi responsable de 5-10% des cas de mortalités néo-natale et infantile en Afrique sub-saharienne (Guyatt and Snow, 2001). Dans cette région, où le complexe *Anopheles gambiae* est le principal vecteur de *P. falciparum* (Mouchet *et al.*, 2004), le paludisme est responsable de 40% des dépenses de santé publique, de 30-50% des admissions dans les hôpitaux et de pas moins de 50% des consultations externes (WHO-Unicef, 2003). Il y est la cause des pertes évaluées à 12 milliards de dollars US chaque année (Greenwood *et al.*, 2005).



Source: http://www.mara.org.za/

Figure 2 : Répartition des zones impaludées en Afrique d'après le projet MARA/ARMA en 2009

En Angola et au Sénégal où les travaux de cette thèse ont été principalement menés, l'épidémiologie du paludisme est particulièrement diversifiée.

En Angola :

Toute la population angolaise est exposée au paludisme avec 92% de risques endémiques et 8% de risques épidémiques. Le paludisme y est de loin la plus grande cause de morbidité (il représente 60% de la demande de soins de santé) et la principale cause de mortalité, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans (Fortes, 2000a). Environ 22 % des décès hospitaliers sont attribuables à cette parasitose (Cuamba *et al.*, 2006). En 2006, près de 3,6 millions de cas cliniques ont été suspectés, dont les 77% confirmés par un diagnostique parasitologiques (WHO, 2009), et environ 21000 décès enregistrés (WHO, 2008). Il impose de ce fait un lourd fardeau économique à la population angolaise, étant surtout à l'origine de pertes estimées à plus de 28 journées/an de travail pour la population active (Fortes, 2000a).

An. gambiae s.s. (*sensu stricto*) constitue le principal vecteur de *P. falciparum*, principal agent du paludisme dans ce pays, avec ses 2 formes moléculaires M (« Mopti ») et S (« Savannah »). *An. funestus*, *An. arabiensis* et *An. melas* peuvent jouer un rôle secondaire dans la transmission de cette espèce plasmodiale majoritaire (F. Fortes, communications personnelles).

Au Sénégal:

Au Sénégal, le paludisme constitue aussi un problème de santé publique majeur. En effet, il y sévit de façon endémique (avec différents niveaux d'endémicité) avec une transmission saisonnière. Le paludisme y est la plus grande cause des demandes de soins de santé et la principale cause de mortalité, en particulier chez les enfants de moins de 5 ans. En 2006, près de 1,5 millions de cas cliniques (400 milles environ chez les enfants de moins de 5 ans) et 10 milles cas de décès (9 milles chez les enfants de mois de 5 ans) ont été enregistrés (WHO, 2008). En fin 2009, le nombre de cas de paludisme a chuté à 174 milles cas (PNLP-Sénégal, 2010).

Les caractéristiques de l'endémicité sont spécifiques aux zones géographiques (**Figure 3**).

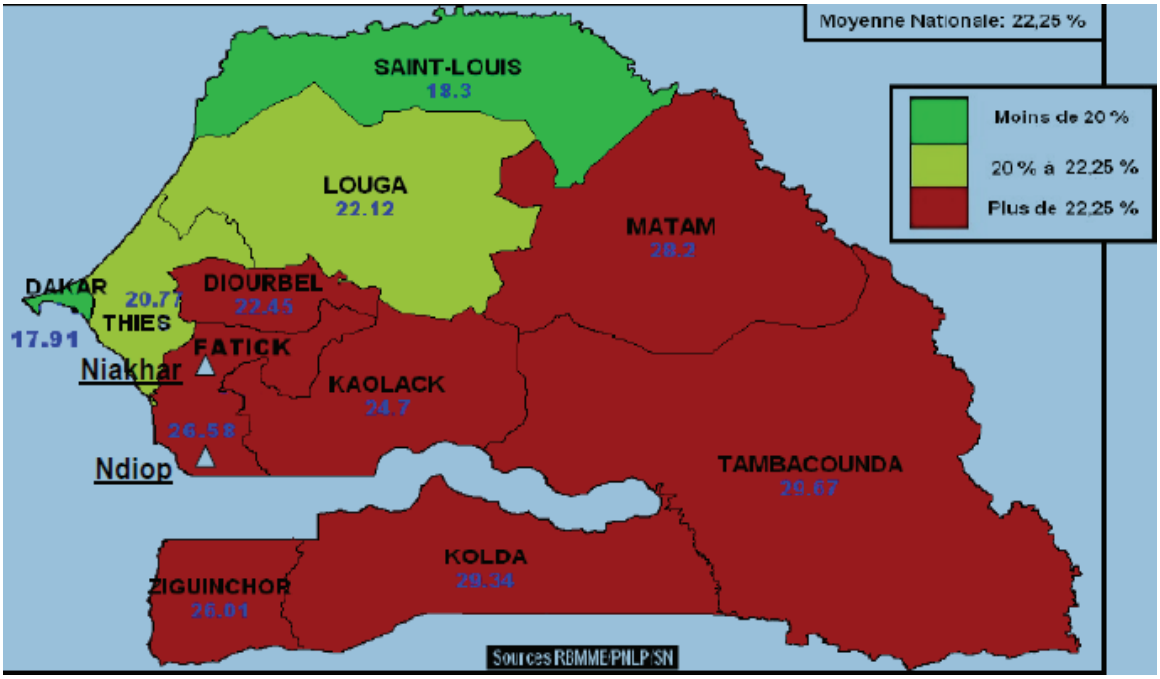


Figure 3 : Prévalence de la morbidité palustre en fonction des régions au Sénégal en 2007. D'après le PNLP-Sénégal.

Dans la région du nord Sénégal, le paludisme est hypo-endémique avec une transmission faible et instable. Dans la région du centre, où une partie de nos travaux a été effectuée, le paludisme est méso-endémique avec une transmission saisonnière. Une immunité est acquise chez les enfants d'une dizaine d'années mais des formes sévères peuvent être observées pour toute la population. Dans la région du sud Sénégal, le paludisme est hyper-endémique avec des recrudescences saisonnières.

Les vecteurs majeurs appartiennent au complexe *An. gambiae* et à *An. funestus*. *An. pharoensi* et *An. nili* sont suspectés de jouer un rôle « secondaire » dans la transmission de *P. falciparum* (PNLP-Sénégal, 2010). Ce dernier est le principal agent du paludisme (responsable de 90% des cas), mais des associations avec *P. malariae et P. ovale* ont été retrouvées dans 1-15% et 1-5% des cas respectivement (Faye *et al.*, 1995).

I- 2-2- Les Protagonistes

I-2-2-1- Les Agents pathogènes

a- Les *Plasmodium* humains

Les agents étiologiques du paludisme sont des protozoaires de l'embranchement des *Apicomplexa* (protozoaires à appareil apical complexe), de la classe des *Sporozoae*, de l'ordre des *Haemosporidia*, de la famille des *Plasmodidae* et appartiennent au genre *Plasmodium*.

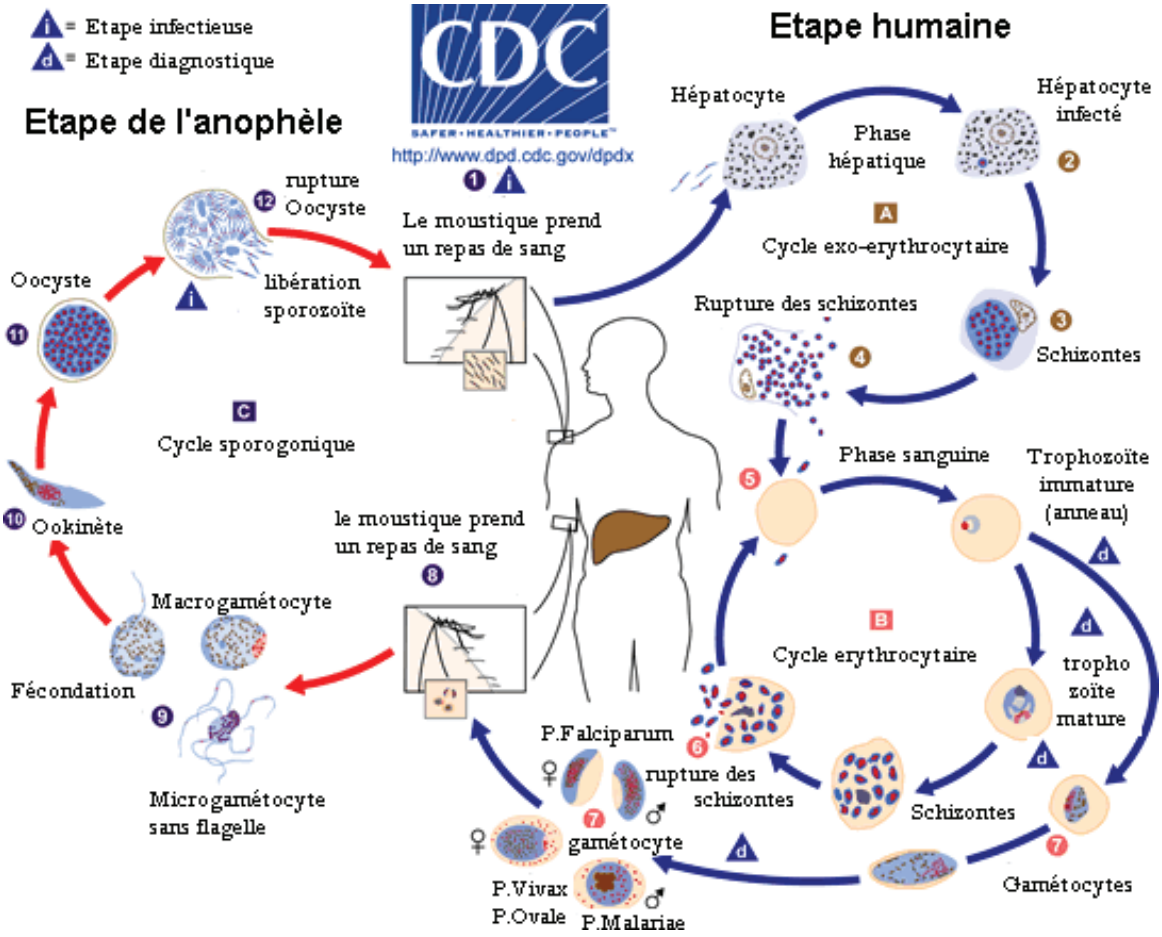
Sur plus d'une centaine d'espèces du genre *Plasmodium* parasitant batraciens, reptiles, oiseaux ou mammifères, seules cinq peuvent infecter l'Homme :

- *P. falciparum* (Welch, 1887) est responsable de la fièvre tierce maligne. Elle est la plus fréquente en Afrique sub-saharienne où 80 à 95% des cas de la maladie lui sont associés. Elle est aussi la plus redoutable car pouvant être à l'origine des formes graves, voire mortelles en l'absence de traitement approprié (WHO, 2000).
- *P. vivax* (Grassi, 1890) responsable de la fièvre tierce bénigne. Elle est aussi très répandue dans le monde et évolue avec des rechutes à long terme. Elle est rare en Afrique, plus fréquente en Asie, Océanie, Amérique du Sud et Centrale.
- *P. ovale* (Stephens, 1922) est l'agent aussi d'une fièvre tierce bénigne. Elle est très proche de *P. vivax* avec laquelle elle a été très longtemps confondue. Elle évolue à long terme et est donc considérée comme peu pathogène. Elle est rare et se rencontre presque exclusivement en Afrique de l'Ouest
- *P. malariae* (Laveran, 1881) est responsable d'une fièvre quarte et de troubles rénaux. Elle responsable d'environ de 1% des cas de paludisme seulement. Elle se rencontre surtout en Amérique du Sud où elle est très fréquente dans certaines tribus d'Amérindiens.
- *P. knowlesi* proche génétiquement de *P. vivax*, et microscopiquement de *P. malariae*. Il a été découvert récemment chez l'Homme en Malaisie (mais était connu antérieurement chez le singe) (Cox-Singh *et al.*, 2008; Cox-Singh and Singh, 2008).

Remarque : les 3 premières espèces sont spécifiquement humaines alors que les deux dernières sont communes à l'Homme et aux grands singes africains.

b- Cycle de développement de *Plasmodium*

Deux hôtes successifs sont nécessaires à l'accomplissement du cycle des plasmodies (**Figure 4**) : **hôte vertébré** où se déroule la multiplication asexuée ou schizogonie et **moustique Culicidae** du genre *Anopheles* (pour les plasmodies infectant l'Homme), lieu de la multiplication sexuée ou sporagonie.



Source : http://www.cdc.gov/malaria/

Figure 4 : Cycle du développement des *Plasmodium spp*

b-1- Schizogonie chez l'Homme

Au cours de la piqûre, l'anophèle femelle infesté injecte avec sa salive, au niveau de la peau, des sporozoïtes contenus dans ses glandes salivaires. Ces éléments unicellulaires filiformes, à travers la circulation générale, se répartissent rapidement dans tout l'organisme, pénètrent activement et indifféremment dans différents types cellulaires. Certains sporozoïtes vont cependant pénétrer dans des vaisseaux lymphatiques où ils seront dégradés par le système immunitaire (Amino *et al.*, 2006). Seuls les survivants ayant gagné le foie et franchi une dernière barrière constituée par les cellules de Kupffer pourront poursuivre leur cycle dans les hépatocytes (Ishino *et al.*, 2004). On estime qu'un anophèle infecté peut injecter à son hôte 1 à 1000 sporozoïtes (120 en moyenne) au moment d'une piqûre (Bejon *et al.*, 2005).

- La phase hépatique

Dans les hépatocytes, les sporozoïtes s'arrondissent et se transforment en trophozoïtes. Certains trophozoïtes, par multiplication et développement, évoluent immédiatement jusqu'à

maturité pour donner des schizontes alors que d'autres restent sous forme uninuclée et sont appelés hypnozoïtes (Jiang *et al.*, 1988). Ces 2 types d'évolution dépendent de l'espèce plasmodiale et expliquent les rechutes observées chez *P. vivax* et *P. ovale* chez lesquels les hypnozoïtes (formes dormantes) ont été soulignés contrairement à *P. falciparum* chez qui les sporozoïtes entrent en évolution immédiate (Greenwood *et al.*, 2005). A maturité, les schizontes éclatent, libérant des mérozoïtes, nouvelles formes uninuclées qui initieront la phase érythrocytaire en envahissant les globules rouges.

Cette phase hépathique constitue la partie cliniquement silencieuse et asymptomatique du cycle. Elle correspond, en effet, à une période d'incubation dont la durée (5 à 15 jours) et la fréquence (périodicité) sont fonction de l'espèce plasmodiale. La durée de cette phase varie de 5-6 jours chez *P. falciparum* à 10-14 jours, ou occasionnellement plus, chez *P. vivax* (White, 2004)

- la phase érythrocytaire

Les mérozoïtes, libérés dans le sang par la rupture de l'hépatocyte, envahissent les globules rouges, selon un processus en plusieurs étapes, s'y déplacent par des mouvements amiboïdes vers le centre où ils se transforment en trophozoïtes, sièges d'importantes activités métaboliques (Carter and Miller, 1979). Les trophozoïtes vont ainsi croître en dégradant l'hémoglobine et évoluer en schizontes dans lequel s'accumule l'hémozoïne (pigment malarique, produit de dégradation de l'hémoglobine qui remplit progressivement la vacuole nutritive parasitaire). De nombreuses divisions nucléaires se produisent dans les schizontes aboutissant ainsi à la formation de nouveaux mérozoïtes qui sont libérés lors de l'éclatement des schizontes matures (corps rosacés). Chaque mérozoïte peut alors infester une nouvelle hématie et ainsi recommencer le cycle intra-érythrocytaire. La lyse des hématies parasitées par les schizontes mûrs est responsable des accès fébriles, symptômes cliniques caractéristiques du paludisme. Après plusieurs cycles intra-érythrocytaires, une fraction des mérozoïtes pénètrent dans les globules rouges et se différencient en gamétocytes mâles et femelles qui, lorsqu'ils sont ingérés au cours d'un repas sanguin, permettent la poursuite du cycle du parasite chez le moustique (Ghosh *et al.*, 2000). La distribution des stades érythrocytaires dans le sang n'est pas toujours homogène (White and Ho, 1992) et, dans certaines circonstances, certains stades parasitaires disparaissent du sang périphérique parcequ'ils sont retenus (ou « séquestrés ») dans les capillaires profonds de différents tissus ou organes profonds (cerveau, coeur, rate, intestin, moelle osseuse et placenta).

Une caractéristique marquante du cycle érythrocytaire est le fait que les parasites ont tendance à se développer de façon synchrone, les parasites examinés sur un frottis sanguin sont fréquemment tous au même stade de développement et les symptômes cliniques (en particulier la fièvre) ont tendance à survenir à intervalles réguliers. Cette synchronicité du cycle biologique de *Plasmodium* serait en partie déterminée par le rythme circadien de l'hôte.

b-2- Sporogonie chez le moustique femelle

En prenant son repas sanguin sur un individu infecté par *Plasmodium*, le moustique absorbe les différents stades du parasite (sexués et asexués) (Robert *et al.*, 1994). Mais seuls les stades sexués (gamétocytes) poursuivront leur développement, les autres étant digérés au niveau de l'estomac de l'insecte (Frischknecht *et al.*, 2004). Rapidement, par expulsion des corpuscules chromatiniens, le gamétocyte femelle se transforme en macrogamète, alors que la microgamétogénèse mâle ou ex-flagellation est plus lente et donne naissance à 8 microgamètes qui vont rapidement à la rencontre du macro-gamète (Rickman *et al.*, 1990). La fécondation donne naissance à un ookinète, œuf mobil qui traverse la paroi stomacale du moustique et migre vers la face externe de l'épithélium intestinal où il s'enkyste pour former l'oocyste mature dans lequel s'individualisent les sporozoïtes (Robert *et al.*, 1994). Libérés à la suite de l'éclatement de l'oocyste, ces derniers vont, via l'hémolymphe, gagner par prédilection les glandes salivaires (Davies, 1974) de l'insecte pour être inoculé lors d'une piqûre infectante ultérieure.

I-2-3- Méthodes diagnostiques de l'infection

Les différents moyens utilisés pour le diagnostic du paludisme sont soit directs, soit indirects. Les techniques directes sont essentiellement parasitologiques, les méthodes indirectes font appel à l'immunologie ou à la biologie moléculaire. Un diagnostic basé sur les signes cliniques (symptomatologie) peut être utilisé en zone d'endémie.

I-2-3-1- Diagnostic clinique : évaluation de la morbidité

L'évaluation de la morbidité se fait avec de très grandes difficultés car basé sur l'enregistrement des cas de paludisme à partir des signes cliniques, telle que la fièvre, qui ne sont pas forcément spécifiques au paludisme et qui varient avec le degré de transmission (WHO, 2006c). De plus, le portage asymptomatique de *Plasmodium* est fréquent en zone d'endémie. On distingue :

- **Accès palustres simples** : fièvre (39-40° C), céphalées, vomissements, diarrhées, triade « frissons-chaleur-sueur » (jamais pour la primo-invasion, forme simple du paludisme chez les adultres non immuns)

- **Accès palustres graves** : Trois formes cliniques prédominent : le neuropaludisme, l'anémie grave, la détresse respiratoire. Les facteurs de gravité sont : le neuropaludisme (profondeur du coma, convulsions répétées, âge < 3 ans, parasitémie > 20%), et l'hypoglycémie attribuée au paludisme. Ces complications majeures sont dues uniquement à *P. falciparum* et s'observent fréquemment avec un ictère (coloration jaune de la peau) et une anémie sévère. Ces signes sont évocateurs en zone d'endémie infectée ou après un séjour du patient dans une telle zone. Les critères de gravité (critères OMS) du paludisme sont les mêmes chez l'adulte et chez l'enfant et se résument ainsi :

- Neuropaludisme (score de Glasgow < 9, score de Blantyre <2 chez l'enfant de moins de 5 ans)
- Troubles de la conscience (score de Glasgow <15 et >9)
- Convulsions répétées (> 1/ 24 heures)
- Prostration (état de faiblesse et de fatigue extrêmes qui se manifeste par l'effondrement des fonctions musculaires du patient et par son immobilité)
- Syndrome de détresse respiratoire
- Ictère (clinique)
- Acidose métabolique (bicarbonates plasmatiques < 15 mmol/L)
- Anémie grave (Hb < 5g/dl ou Ht < 15%)
- Hyperparasitémie (> 4% chez le sujet non immun ou > 20% chez le sujet immun)
- Hypoglycémie (< 2,2 mmol/L)
- Hémoglobinurie macroscopique
- Insuffisance rénale
    - Adulte : diurèse < 400 mL /24h ou créatininémie > 265 µmol/L
    - Enfant : diurèse < 12mL/kg/24h ou créatininémie élevée pour l'âge
- Collapsus circulatoire (TAS <50 mm Hg avant 5 ans, TAS < 80 mm Hg après 5 ans)

- Hémorragie anormale

- Oedème pulmonaire (radiologique)

I-2-3-2- Diagnostic biologique

I-2-3-2-1- Diagnostic biologique non spécifique

La numération de la formule sanguine montre une cytopénie (anémie, leucopénie, thrombopénie) et peut donner une idée sur la gravité du paludisme. Mais cette méthode n'est pas précise car ces anomalies ne sont pas toujours dues au paludisme, même si l'anémie est souvent utilisée dans le diagnotic du paludisme grave chez l'enfant en zone d'endémie. De ce fait, ces méthodes imprécises de diagnostic sont peu utilisées.

I-2-3-2-2- Diagnostic biologique spécifique

Il est basé sur des approches parasitologiques, immunologiques et sur la biologie moléculaire. A cet effet, diverses méthodes et techniques sont utilisées.

a- Les techniques microscopiques conventionnelles

La méthode de référence de détection des infections plasmodiales repose sur la mise en évidence microscopique directe des parasites dans du sang étalé en goutte épaisse ou en frottis mince sur une lame de verre et coloré, généralement au Giemsa (Wongsrichanalai *et al.*, 2007).

Le frottis mince : Il se fait, soit par prélèvement capillaire au bout du doigt avec confection immédiate du frottis, soit par ponction veineuse avec prélèvement dans un tube contenant un anticoagulant et réalisation secondaire des lames d'examen. Il permet l'étude morphologique des hématozoaires et le diagnostic différentiel entre les espèces plasmodiales. Mais il ne permet presque pas le calcul de la densité parasitaire, du fait de la determination fastidieuse du nombre minimum de champs à lire. Le frottis mince sur lame de verre est réalisé en étalant environ 1 à 1,5 µL de sang sur une surface de l'ordre de 800 mm2. L'examen de 200 champs microscopiques couvre alors environ 0,01 à 0,02 µL de sang, soit 40 fois moins que sur une goutte épaisse.

La goutte épaisse : examen de référence de l'OMS, elle est largement utilisée pour le diagnostic de routine du paludisme. Sa sensibilité est 20 à 30 fois plus élevée que celle du

frottis mince. C'est une technique de concentration des hématies permettant d'identifier les stades sanguins du parasite (trophozoïtes, mérozoïtes et gamétocytes). Elle est réalisée avec 3 à 4 µL de sang étalé sur une surface ronde, carrée ou rectangulaire d'environ 8-10 mm de diamètre ou de côté. Idéalement, 15 à 20 leucocytes doivent être visibles sur les champs microscopiques (oculaires 5x à 7x, objectif 100x à immersion). Dans ces conditions, l'examen de 200 champs microscopiques couvre environ 0,4 à 0,6 µL de sang.

Le frottis sanguin permet un meilleur examen de la morphologie des parasites et des hématies et donc un diagnostic d'espèce plasmodiale plus aisé. Cependant sa sensibilité est beaucoup trop faible pour avoir un intérêt en épidémiologie. Ainsi, la détection microscopique des infections plasmodiales dans les études épidémiologiques repose souvent sur la goutte épaisse.

L'apposition placentaire : elle permet d'évaluer les infections par les *Plasmodium* des placentas des femmes enceintes qui constituent, avec les nouveau-nés, des populations à très haut risque de paludisme. Elle consiste à apposer de la face maternelle d'un fragment du placenta sur une lame de verre et rechercher sous microscope d'éventuelles parasites. L'examen histologique du placenta peut aussi être utilisé (Rogerson *et al.*, 2003). Ces méthodes permettent de détecter les plasmodiums et le pigment malarique résiduel présent dans des macrophages qui témoignent de l'infection récente ou ancienne de la mère, avec une plus grande sensibilité que la goutte épaisse réalisée avec du sang capillaire.

b- QBC (Quantitative Buffer Coat)^{TM} malaria test

Le QBC^{TM} Malaria test repose sur l'isolement des hématies parasitées et la coloration de leur ADN par l'acridine orange, leur concentration dans un tube capillaire par gravimétrie (*i.e.* centrifugation) et leur détection microscopique en lumière ultraviolette. Le diagnostic positif repose sur une image associant un noyau et un cytoplasme, en situation intra-érythrocytaire, comparable au diagnostic sur frottis mince. Cependant, les caractéristiques morphologiques permettant le diagnostic d'espèce ne sont pas discernables. Ainsi, le diagnostic d'espèce repose sur le monomorphisme des stades jeunes des formes sanguines et leur répartition homogène dans le capillaire en faveur d'une infection par *P. falciparum*, le polymorphisme des formes parasitaires et leur concentration proche des couches leucocytaires évoquant une autre espèce plasmodiale. Malgré la grande sensibilité de cette méthode, son coût, l'absence d'estimation de la densité parasitaire et de spécificité d'espèce plasmodiale limitent son

intérêt en épidémiologie aux recherches des densités parasitaires les plus faibles et au diagnostic des accès palustres chez les individus peu ou non immuns (De Pina *et al.*, 2007).

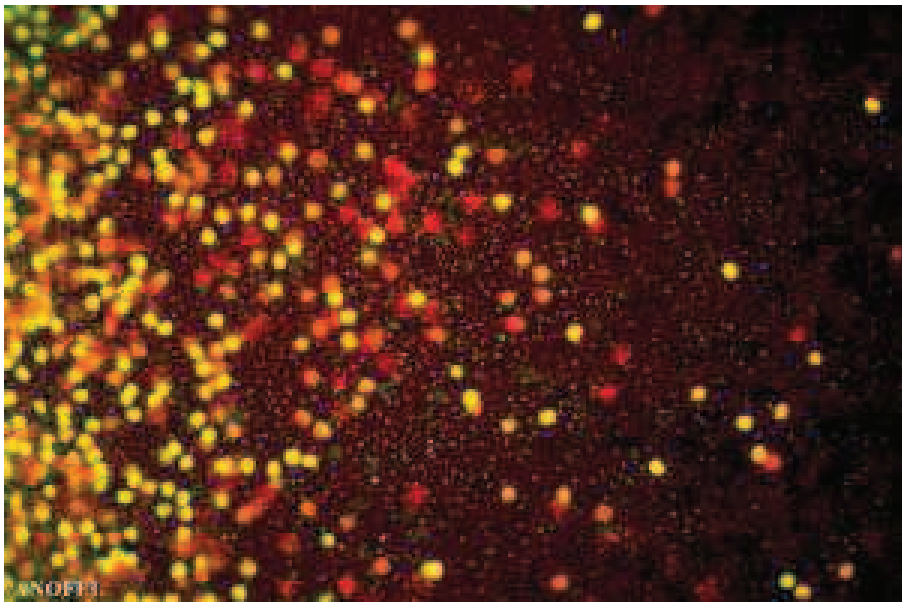


Figure 5 : Recherche de *Plasmodium spp*. par la technique du QCB® Malaria

Source : http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/

Commentaire :

Dans un tube capillaire hépariné muni d'un flotteur, on effectue la coloration des parasites par l'acridine orange. Après centrifugation, on procède à un examen du tube en microscopie à fluorescence. Les trophozoïtes apparaissent sous forme de points verts fluorescents.

c- Tests de diagnostic rapide (TDR) par immunocapture d'antigènes plasmodiaux

Ces tests reposent sur la migration d'antigènes de plasmodiums, contenus dans le sang périphérique, sur une membrane de nitrocellulose et sur leur détection par immunocapture (anticorps fixés sur membrane) et immunomarquage (anticorps marqué par de l'or colloidal ou du sélénium) (Murray *et al.*, 2008). Ces tests sont faciles et rapides d'emploi (< 20 minutes), relativement bon marché (de 0,4 à 3 euros par test) et ne nécessitent ni source d'électricité ni entraînement poussé des manipulateurs. Cependant certaines études ont rapporté que ces tests, avec une sensibilité de l'ordre de plusieurs centaines de parasites par microlitres de sang (< 500 /µL) pour *P. falciparum,* seraient moins sensibles que la méthode de la goutte épaisse (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). La qualité de ces tests peut varier d'un lot à l'autre et peut être altérée par des températures ou des humidités extrêmes. La plupart des tests sont à conserver entre 4 et 30°C, à moins de 70 % d'humidité. La majorité des tests

utilisés ne détectent que *P. falciparum,* mais il existe quelques tests qui détectent les autres espèces plasmodiales, selon les antigènes cibles. En pratique, les tests commercialisés combinent souvent la détection de plusieurs antigènes, en fonction des conditions épidémiologiques où ils doivent être employés (Wongsrichanalai *et al.*, 2007). Ces antigènes sont généralement les suivants :

1) **l'HRP2** (histidin rich protein 2) de *P. falciparum :* cet antigène est secrété par les formes asexuées et les jeunes gamétocytes et peut persister dans le sang périphérique plus de 15 jours après la disparition des parasites. Sa détection fait l'objet de faux positifs en présence de facteur rhumatoïde ou de faux-négatifs à cause de mutations du gène *hrp* ou de présence d'anticorps anti-HRP2.

2) **la LDH** (lactate déshydrogénase) : selon les tests, la LDH de *P. falciparum,* la LDH de *P. vivax* ou les LDH des quatre principales espèces de *Plasmodium* infectant les humains peuvent être détectés. La sensibilité des tests détectant la LDHe est meilleure pour *P. falciparum* Cet antigène est aussi secrété par les formes asexuées et les gamétocytes mais il disparaît plus rapidement du sang que l'HRP2.

3) **l'aldolase :** des anticorps capables de reconnaître les aldolases de tous les plasmodiums humains peuvent être utilisés. La sensibilité de détection de ces antigènes est cependant encore moindre que celle des tests détectant l'HRP2 et la LDH.

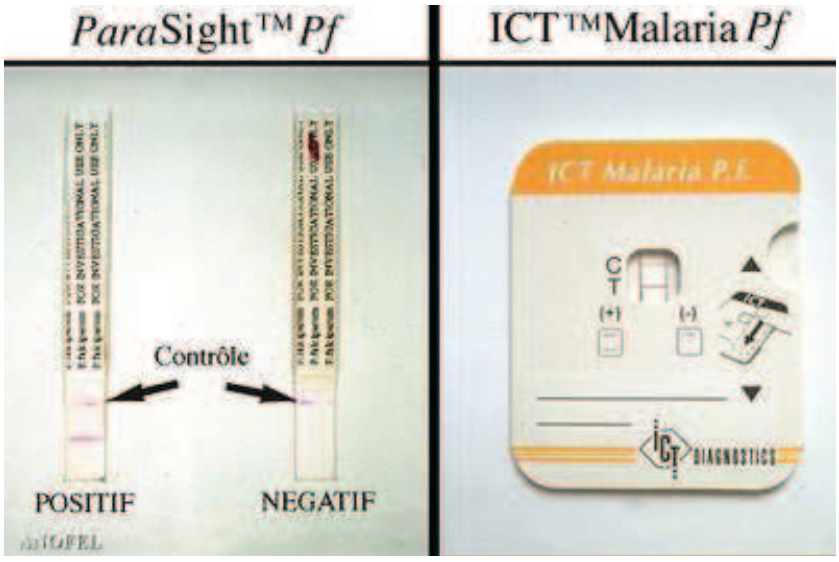


Figure 6 : Recherche d'antigènes circulant de *P. falciparum*

Source : http://www-sante.ujf-grenoble.fr/SANTE/

Commentaire : la recherche des antigènes circulants (ici, HPR2) se fait sur bandelette à l'aide d'un anticorps monoclonal.

L'avantage essentiel de ces tests est leur rapidité et leur facilité d'emploi. De plus, ils ne nécessitent pas une formation et ni un entraînement important. Leur défaut majeur est leur manque de sensibilité et l'absence d'estimation de la densité parasitaire. Le manque de sensibilité (faux négatifs) de ces tests est acceptable pour le diagnostic de la morbidité palustre dans les zones d'endémie où les accès palustres s'accompagnent habituellement de densités parasitaires élevées. Il limite cependant leur intérêt pour les études épidémiologiques menées dans les populations asymptomatiques et dans les populations où les densités parasitaires sont basses (Murray *et al.*, 2008). Néanmoins ces TDR sont très disponibles et constituent actuellement un outil de masse pour la détection des plasmodiums en milieu hospitalier ou lors de diagnostics de routine organisés par les PNLP de la plupart des pays endémiques.

d- Méthodes immunologiques : la sérologie

Les méthodes sérologiques de diagnostic de l'infection palustre reposent sur la recherche d'anticorps dirigés contre des antigènes plasmodiaux. Ces antigènes peuvent être des antigènes natifs présents à la surface ou dans les parasites entiers utilisés en immunofluorescence indirecte (IFI) ou contenus dans des extraits obtenus à partir de parasites en culture et utilisés en ELISA. Ces antigènes peuvent aussi être des protéines recombinantes ou des polypeptides synthétiques. Les antigènes natifs sont généralement des antigènes de stades érythrocytaires asexués, le plus souvent de stades schizontes.

La quantité d'Ac dirigés contre de multiples antigènes serait ainsi proportionnelle à l'intensité du contact avec le parasite et à la durée de l'infection (Bruce-Chwatt *et al.*, 1975). La sérologie apparaît être plus sensible que la mise en évidence des parasites, car elle est indépendante des fluctuations de la parasitémie et reste positive en cas de parasitémie subpatente. Ainsi plusieurs études immuno-épidémiologiques ont montré que la réponse anticorps (Ac) contre certains antigènes des stades pré-érythrocytaires et érythrocytaires (sanguins) de *P. falciparum* pourraient représenter une « image » du degré de transmission (Drakeley *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 1998). Des protéines des stades précoces (CSP, TRAP, LSA1, SALSA…) considérés pour leur activité immunogènique et leur relation avec la transmission pourraient être de bons marqueurs d'évaluation de l'intensité de la transmission. En effet, dans les années 1990, il a été suggéré que les réponses IgG contre des antigènes des stades mérozoïtes et sprorozoïtes pourraient être utilisées comme des marqueurs sérologiques de transmission (Ramasamy *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1992). Ces méthodes permettaient de distinguer une dynamique de transmission en fonction de la saison et de différencier des

foyers avec une forte ou faible exposition au paludisme. Mais les limites majeures de ce type de marqueur immunologique, quand il est évalué chez des enfants exposés, étaient liées aux très faibles niveaux de réponses Ac (très faible titre Ac) et au fort polymorphisme antigénique entre les souches de *Plasmodium* (Ramasamy *et al.*, 1994).

e- Tests moléculaires

Depuis 1984, les techniques d'amplification génique *in vitro* sont en pleine expansion dans le diagnostic de la présence de *P. falciparum* et les études épidémiologiques sur paludisme (Franzén *et al.,* 1984). Au départ, ces techniques étaient fondées sur l'hybridation moléculaire de sondes ciblant des séquences spécifiques d'ADN parasitaire. Aujourd'hui, elles sont basées sur la PCR (« Polymerase Chain Reaction ») qui permet la détection de parasitémies très faibles avec une spécificité de 100%. La limite de détectabilité de la PCR se situe aux alentours de 0,01 parasites/µl de sang, permettant en théorie de détecter un parasite dans un échantillon analysé de 100µl (Druilhe *et al.*, 2001; Hommel and Schrevel, 1998). La PCR est ainsi plus sensible que la microscopie et les techniques de recherche d'antigènes circulants (Filisetti *et al.*, 2002; Rubio *et al.*, 2001). Cependant, c'est une technique demandant du personnel qualifié, des locaux et du matériel appropriés et surtout des moyens financiers importants limitant son essor dans les pays impaludés et en particulier au niveau des structures de santé. Leur adaptation au haut débit est cependant possible et leur coût peut être diminué. Ces méthodes sont les seules à permettre, en épidémiologie, de distinguer les populations plasmodiales présentes simultanément dans un même isolat et d'analyser leur diversité génétique et leur dynamique intra-hôte, à l'échelle d'une communauté humaine (*e.g.* un village), d'un pays, d'un continent ou de la planète (Anderson *et al.*, 2000; Zwetyenga *et al.*, 1999). Elles peuvent aussi aider à distinguer les recrudescences des nouvelles infections dans les essais d'efficacité des médicaments antipaludiques (Snounou and Beck, 1998; WHO, 2008a). Mais elles ne sont pas encore reconnues comme méthodes de référence car leurs performances et leur fiabilité dépendent de la variabilité génétique des séquences d'ADN plasmodial ciblées (Calderaro *et al.*, 2007).

I-2-4- Pathogenèse et Symptomatologie du paludisme

La symptomatologie du paludisme dépend principalement de la virulence du parasite, du niveau d'immunité acquis par l'individu infecté et d'un certain nombre de facteurs génétiques pouvant conditionner la sensibilité des individus à l'infection plasmodiale (Kwiatkowski and Marsh, 1997). Le stade pré-érythrocytaire du parasite n'est responsable d'aucune forme de

pathologie. Seul le stade érythrocytaire engendre des symptômes du fait de l'éclatement rythmique des schizontes.

I-2-4-1- Infection asymtômatique et immunité de prémunition

Chez les sujets vivants en zone d'endémie, le parasitisme (présence de l'infection palustre) constant est fréquent. Les taux de prévalence des infections plasmodiales chez les enfants peuvent atteindre 80%, sans qu'aucun symptôme ne laisse supposer la présence d'une infection. C'est le portage asymptomatique de parasites. La durée de survie d'une infection au stade sanguin peut atteindre 1 an pour *P. falciparum* et 3 ans pour *P. malariae* (Covell, 1960) et varie en fonction de l'âge de l'hôte dans ces zones d'endémie (Smith *et al.*, 1999). La sensibilité du sujet au paludisme varie aussi avec l'âge : après 5 ans, les accès graves sont rares et à partir de 10-15 ans les accès simples deviennent de plus en plus bénins. De plus, des cas graves ont souvent été relevés dans des zones de paludisme instable (transmission saisonnière) et notamment lors d'épidémies contrairement aux zones de paludisme stable (transmission forte et permanente). Ces phénomènes semblent s'expliquer par une acquisition différente de l'immunité anti-palustre, dite « de prémunition » (Sergent 1950), en fonction du degré de transmission des foyers. Cette immunité traduit un équilibre hôte-parasite après plusieurs années d'exposition intense. Elle est entretenue par des stimulations antigéniques dues à des infections palustres et à l'exposition aux piqûres anophéliennes infectantes (Struik and Riley, 2004). Son développement dépend du contexte épidémiologique, de la saisonnalité et de l'intensité de transmission au niveau de la zone géographique (Rogier, 2003; Rogier *et al.*, 1999). Elle apparaît d'autant plus rapidement que la transmission est importante et permanente. Elle protège d'abord contre la mortalité et les formes graves palustres, puis contre les accès palustres simples en diminuant leur incidence et enfin en réduisant la durée et le niveau des infections par les stades sanguins (Deloron and Chougnet, 1992). Elle est labile et disparaît en 12 à 24 mois chez le sujet immun qui quitte la zone d'endémie ou chez la femme enceinte au 2ème et 3ème trimestre de la grossesse (Deloron *et al.*, 1992). Mais le développement de la prémunition n'empêche pas le portage de parasites faisant des sujets semi-immuns d'excellents "réservoirs" parasitaires. Cette situation est rencontrée dans la plus grande partie de l'Afrique sub-saharienne.

I-2-4-2- Accès simple ou de primo-invasion

Les accès palustres primaires correspondent aux premiers cycles de développement endo-érythrocytaire du parasite. Chez les sujets non immuns, le délai après une piqûre infectante est

variable : classiquement de 11 jours, il peut osciller entre 9 et 30 jours. La symptomatologie reste le plus souvent atypique. La rupture des schizontes libère des toxines non protéiques, dont le GPI (Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol) notamment (Schofield and Hackett, 1993) et le pigment malarique qui est pyrogène ; ceci provoque une réaction inflammatoire de l'organisme après stimulation de la production de TNF-α par les macrophages, et ainsi un accès de fièvre. Les accès de fièvre à 39-40°C interviennent de manière intermittente, tous les deux jours, ou peuvent être continus. On observe également des frissons, des sueurs, des céphalées, des myalgies, un malaise général, de l'anorexie et des troubles digestifs. On observe parfois une hépatomégalie et une splénomégalie. Les accès de primo-invasion sont rarement observés chez les nourrissons de moins de 6 mois qui présentent des parasitémies sans signe clinique (Kitua *et al.*, 1997). Un accès dû à *P. falciparum* peut à tout moment se transformer en accès grave surtout chez les enfants et les personnes adultes non immunes.

I-2-4-3- Accès sévère

Une parasitémie élevée semble être une composante nécessaire à la sévérité de l'accès palustre (White, 2004).

Des mécanismes distincts caractérisent deux formes de complications pathologiques : l'anémie sévère et l'accès cérébral, appelé aussi accès pernicieux ou neuropaludisme. Ce dernier représente probablement la première cause d'encéphalopathie non traumatique dans le monde (Newton *et al.*, 2000) et est l'expression la plus fréquente du paludisme grave en zone d'endémie.

• <u>Anémie sévère</u>

Dans les régions hyper-endémiques, où le nombre de piqûres infectantes par homme et par an dépasse la centaine, l'anémie sévère (définie comme une concentration d'hémoglobine < 5g/dl) est beaucoup plus fréquente que l'accès cérébral, bien que ses mécanismes physiopathologiques ne soient pas complètement compris. L'anémie, dans le cadre du paludisme, est causée à la fois par destruction des globules rouges infectés et non infectés et par une baise de leur production (Pradhan, 2009). Une inadéquate réponse immune dirigée contre les antigènes du parasite jouerait également un rôle dans la survenue de l'anémie sévère (Haldar and Mohandas, 2009). En effet, les anticorps produits contre les protéines de surface des mérozoïtes, lors de la rupture des schizontes, peuvent moduler les fonctions du rein et des macrophages et entraîner par la même occasion une exacerbation de l'anémie. Elle touche surtout les femmes enceintes et les jeunes enfants (Ekvall, 2003). Il existe peu de

stratégies de lutte contre l'anémie sévère disponibles. La plus utilisée est la transfusion sanguine qui, elle-même, peut être responsable d'autres infections (comme le VIH) surtout en zone d'endémie (Ekvall, 2003). Bien qu'une parasitémie élevée soit nécessaire, la densité parasitaire ne peut pas présager du risque de décès par anémie (Kitua *et al.*, 1997).

• Accès pernicieux ou neuropaludisme (voir I-2-3-1- Diagnostic clinique : évaluation de la morbidité)

L'apparition de symptômes de type neurologique chez un malade suspecté de paludisme doit faire évoquer d'emblée un neuropaludisme et constitue une urgence vitale. Les formes graves surviennent essentiellement chez des sujets non immuns et/ou pour 90% des cas chez des enfants très jeunes. La mortalité du neuropaludisme est élevée (de 10 à 30%) avec des risques de séquelles neurologiques (épilepsie, cécité corticale,…) chez 5 à 20% des enfants (Murphy and Breman, 2001). Le neuropaludisme se caractérise par une perte progressive de conscience aboutissant à un coma. Sans traitement, l'évolution peut être mortelle en 72 heures. Le coma se manifeste par des troubles de la conscience, des convulsions, des troubles du tonus (hypotonie évoluant vers une rigidité de décérébration) et une abolition des réflexes ostéo-tendineux.

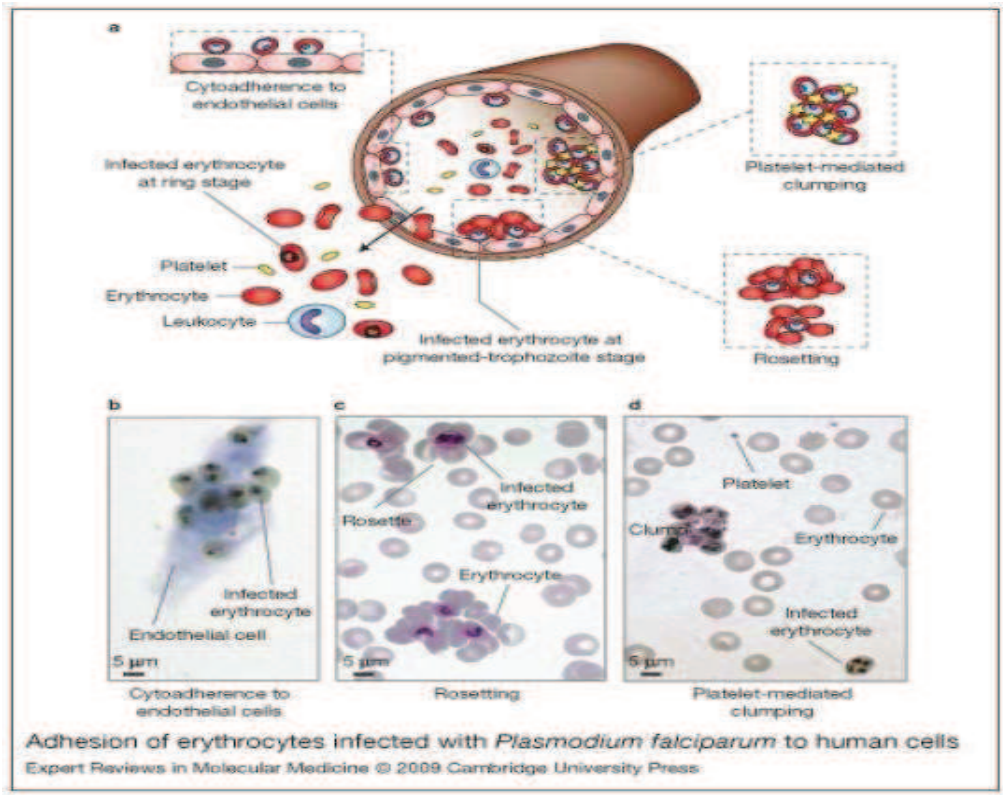


Figure 7 : Adhésion des hématies infectées par *P. falciparum* aux autres cellules de l'hôte humain (la cytoadhérence). D'après (Rowe *et al.*, 2009)

La caractéristique principale de l'accès cérébral est l'obstruction des capillaires et des veinules par les hématies parasitées. La séquestration (**Figure 7a**) des hématies parasitées décrite dans la théorie mécanique est connue depuis 1894. Elle est essentiellement intracérébrale, mais peut s'observer dans la plupart des organes. La masse parasitaire séquestrée est surtout riche en formes matures (trophozoïtes âgés et schizontes) alors que la parasitémie correspond aux formes jeunes du sang périphérique (Newton *et al.*, 2000). Au niveau des micro-vaisseaux cérébraux, cette séquestration est considérée comme un des principaux mécanismes à l'origine du neuropaludisme (White and Ho, 1992). Elle met en jeu trois mécanismes : la cytoadhérence (**Figure 7b)**, la formation de rosettes (**Figure 7c)** et l'auto-agglutination (**Figure 7d)**. La formation de rosettes (petits amas cellulaires issus de la liaison des hématies parasitées avec les hématies normales) semble plus importante quand les symptômes sont plus sévères. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la gravité neurologique et la formation de rosettes *in vitro* (Treutiger *et al.*, 1992). La cytoadhérence est le principal mécanisme de la séquestration, elle correspond à une cytoadhésion entre les hématies parasitées et les cellules endothéliales et permettrait au *Plasmodium* de se développer plus facilement grâce à un environnement favorable et d'échapper à la clairance splénique (Looareesuwan *et al.*, 1987). Seules certaines souches de *Plasmodium* semblent être capables de cytoadhérer (Ringwald *et al.*, 1993). Les "knobs", des protubérances résultant de modifications de la membrane de l'érythrocyte induites par le parasite, ont été impliquées dans le phénomène de séquestration parasitaire. Cette cytoadhésion se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaires spécifiques du parasite (PfEMP1, protéine parasitaire à la surface du globule rouge infectée) et des récepteurs de l'hôte (CD36, ICAM1…) exprimés au niveau de l'endothélium (Sherman *et al.*, 2003). Par ailleurs, l'adhérence des hématies parasitées semble être à l'origine de la mort par apoptose des cellules endothéliales (Pino *et al.*, 2003).

I-2-5- Vecteurs du paludisme en Afrique et quelques éléments de leur bio-écologie

I-2-5-1- Vecteurs en Afrique

Au niveau taxonomique, les vecteurs des *Plasmodium* sont des insectes Diptères appartenant à la famille des *Culicidae* et à la sous-famille des *Anophelinae*. On dénombre environ 450 espèces d'anophèles dans le monde, parmi lesquelles une cinquantaine sont capables de transmettre des plasmodies à l'homme (Mouchet *et al.*, 2004). Dans la pratique, 20 espèces assurent l'essentiel de la transmission dans le monde. Les autres ne participent pas

à la transmission soit parce qu'elles piquent de préférence les animaux, soit parce qu'elles sont réfractaires à une ou plusieurs espèces (ou souches) de *Plasmodium*. Chaque espèce d'anophèle occupe une aire géographique particulière (**Figure 8**). La distribution géographique des anophèles vecteurs présente des similitudes avec la répartition des échantillons de pluie annuelle à travers l'Afrique (Coetzee *et al.*, 2000). Cependant on ne trouve aucune espèce d'anophèle à une altitude supérieure à 2000 m d'altitude.

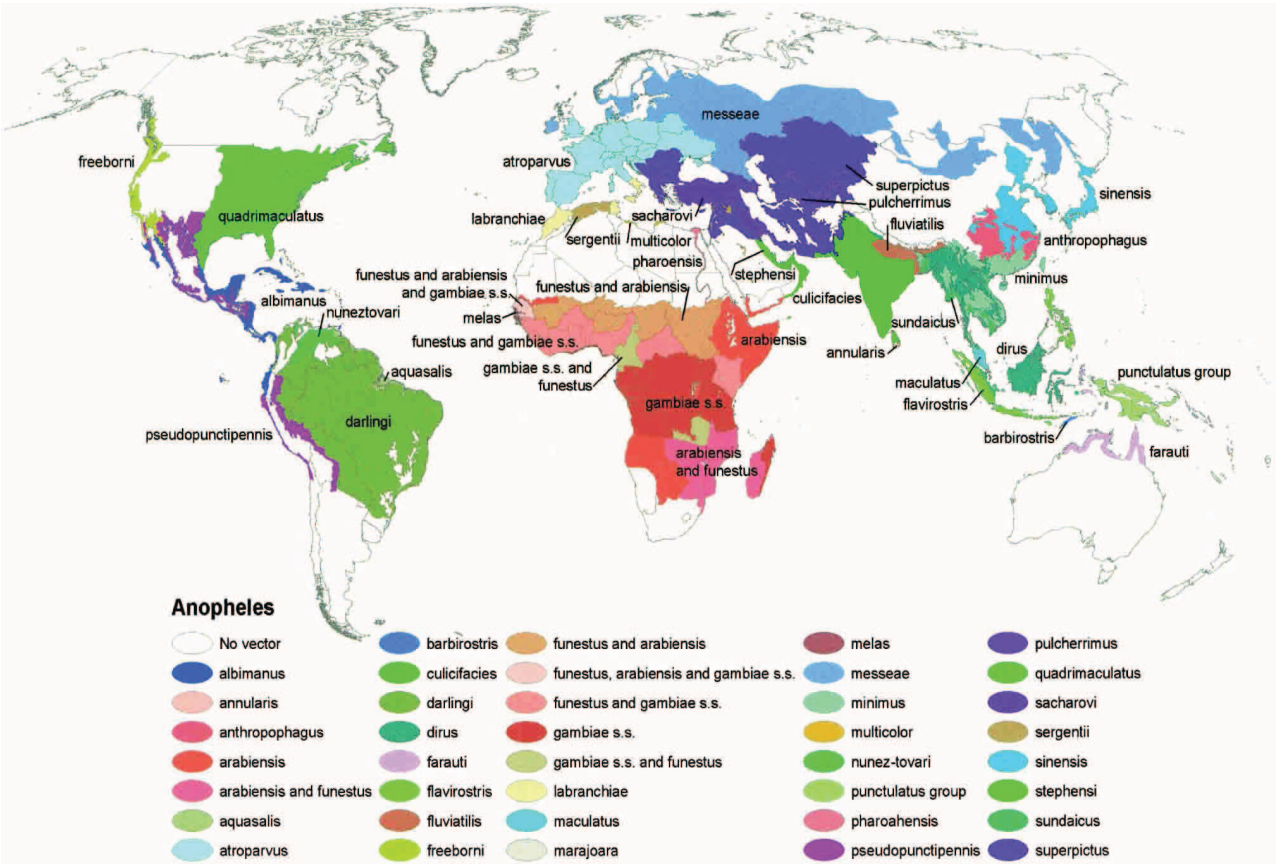
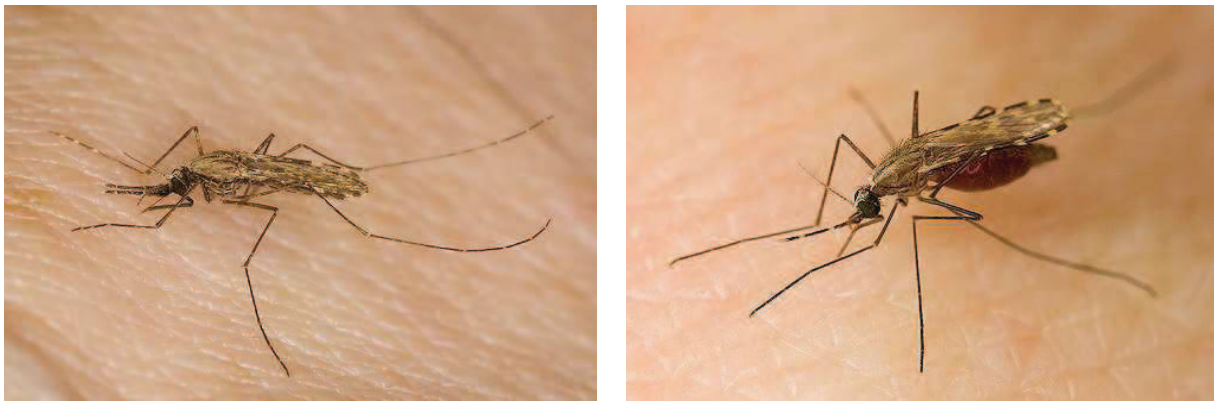


Figure 8 : Distribution globale des vecteurs principaux et secondaires du paludisme dans le monde. D'après (Kiszewski *et al.*, 2004)

En Afrique tropicale, une douzaine d'espèces seulement, mais redoutables par leur efficacité vectorielle, est concernée : celles du complexe *An. gambiae* (*An. gambiae s.s.* et *An. arabiensis* principalement) et l'espèce *An. funestus* (**Figure 8**) assurent la majeure partie de la transmission, *An. nili* et *An. moucheti* jouant aussi un rôle important dans certaines régions (Mouchet *et al.*, 2004). Ces espèces sont connues par leur grande capacité vectrice, ce qui explique en partie la forte endémicité palustre en Afrique (Mouchet *et al.*, 2004).



An. gambiae *An. funestus*

Figure 9 : *An. gambiae* et *An. funestus* lors d'une prise de repas sanguin

Source: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/

Le complexe *An. gambiae s.l. (sensu lato)* présente en Afrique 7 espèces dont *An. gambiae s.s. (sensu stricto) et An. arabiensis* sont les plus importantes en terme de distribution géographique (**Figure 10**) et de capacité vectorielle. Ces deux espèces présentent, en Afrique, des limites de distribution qui semblent être déterminées par les conditions climatiques (Mouchet *et al.*, 2004). *An. gambiae s.s*. occupe les zones de forêt mais remonte loin dans les savanes humides jusqu'à la limite de la ceinture sahélienne pré-désertique. *An. arabiensis* est présente au Sahel et sur les plateaux d'Afrique méridionale. Il s'enfonce assez profondément dans les savanes humides, englobant la zone de répartition d'*An. gambiae s.s*. (Mouchet *et al.*, 2004). La zone de recouvrement en ces deux espèces est d'ailleurs assez large.

Les femelles de ces deux espèces piquent généralement à l'intérieur des maisons, on dit qu'elles sont endophages. Mais l'exophagie, la faculté de prendre leurs repas sanguins hors des domestiques, n'est pas rare, en particulier chez *An. arabiensis*. On peut aussi rencontrer des comportements intermédiaires entre l'endophagie et l'exophagie chez ces deux espèces. C'est par exemple le cas dans le Sahel du Sénégal (Faye *et al.*, 1997). Ces deux espèces sont nettement anthropophiles (Duchemin *et al.*, 2001), sauf si l'abondance de bétail à proximité favorise la zoophilie (Diatta *et al.*, 1998). Le comportement endophile/exophile est variable selon la saison, les préférences trophiques, l'habitat, l'anthropophilie etc. *An. gambiae s.s*. a été reconnu comme composé de plusieurs formes chromosomiques (5 en Afrique de l'Ouest : les formes Forêt, Savane, Bissau, Mopti et Bamako) (Coluzzi *et al.*, 1985; Toure *et al.*, 1983). La prévalence de ces formes répond essentiellement aux variations climatiques (Bayoh *et al.*,

2001; Toure *et al.*, 1998). Le développement d'outils moléculaires d'identification a permis de définir deux formes moléculaires M et S d'*An. gambiae* (della Torre *et al.*, 2001) qui correspondent aux formes chromosomiques Mopti et Savane respectivement (Favia *et al.*, 1997). Les formes moléculaires M et S présentent des préférences écologiques différentes. Les flux de gène semblent limiter entre les formes moléculaires M et S qui présentent des sensibilités différentes aux différents insecticides, notamment aux pyréthrinoïdes (Diabate *et al.*, 2002; Diabate *et al.*, 2004).

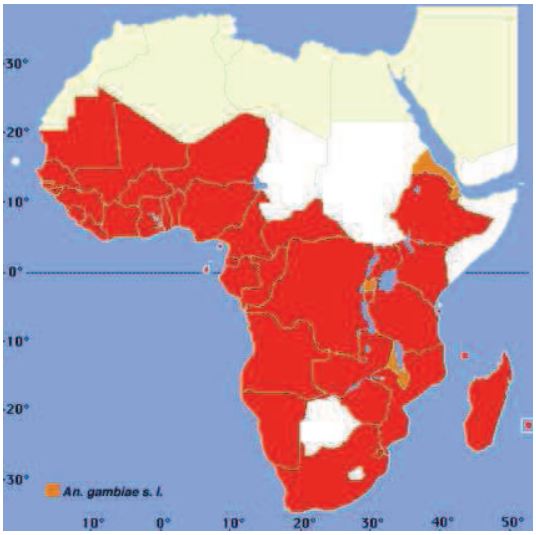


Figure 10: Géo-distribution des vecteurs *Anopheles gambiae s.l.*

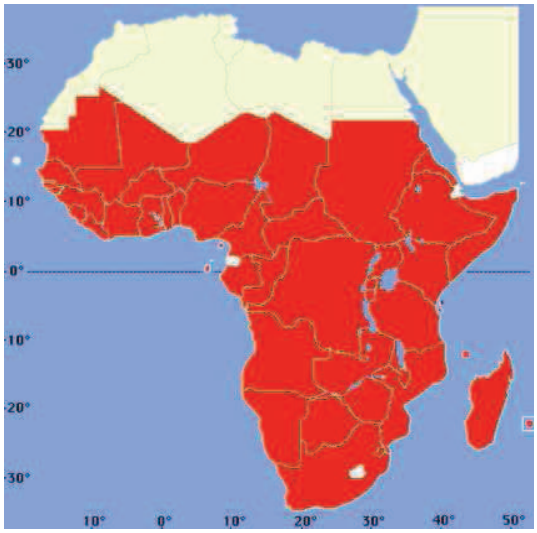


Figure 11: Géo-distribution du vecteur *Anopheles funestus*

L'espèce *An. funestus* est répandue dans toute l'Afrique sub-saharienne sauf dans les parties très sèches du Sud, du Nord et de l'Est du continent (**Figure 11**). Toutefois elle est très localisée dans les grandes forêts du Centre. Comme *An. gambiae* et *An. arabiensis*, elle montre une tendance anthropophile, mais un certain opportunisme tend à augmenter la zoophilie (lorsqu'il y a abondance de bétail sensible par exemple). L'endophagie et l'endophilie sont aussi très marquées chez *An. funestus*. Il est de ce fait un vecteur principal du paludisme en Afrique, après *An. gambiae* et *An. arabiensis. An. funestus*, qui abesoin d'ombre pour se développer, pullule au niveau des marais à végétation dressée et au niveau des rizières et est abondant en fin de saison des pluies et au début de saison sèche où il peut alors prendre le relais d'*An. gambiae*. Il peut être associé à un paludisme stable ou instable suivant le contexte épidémiologique.

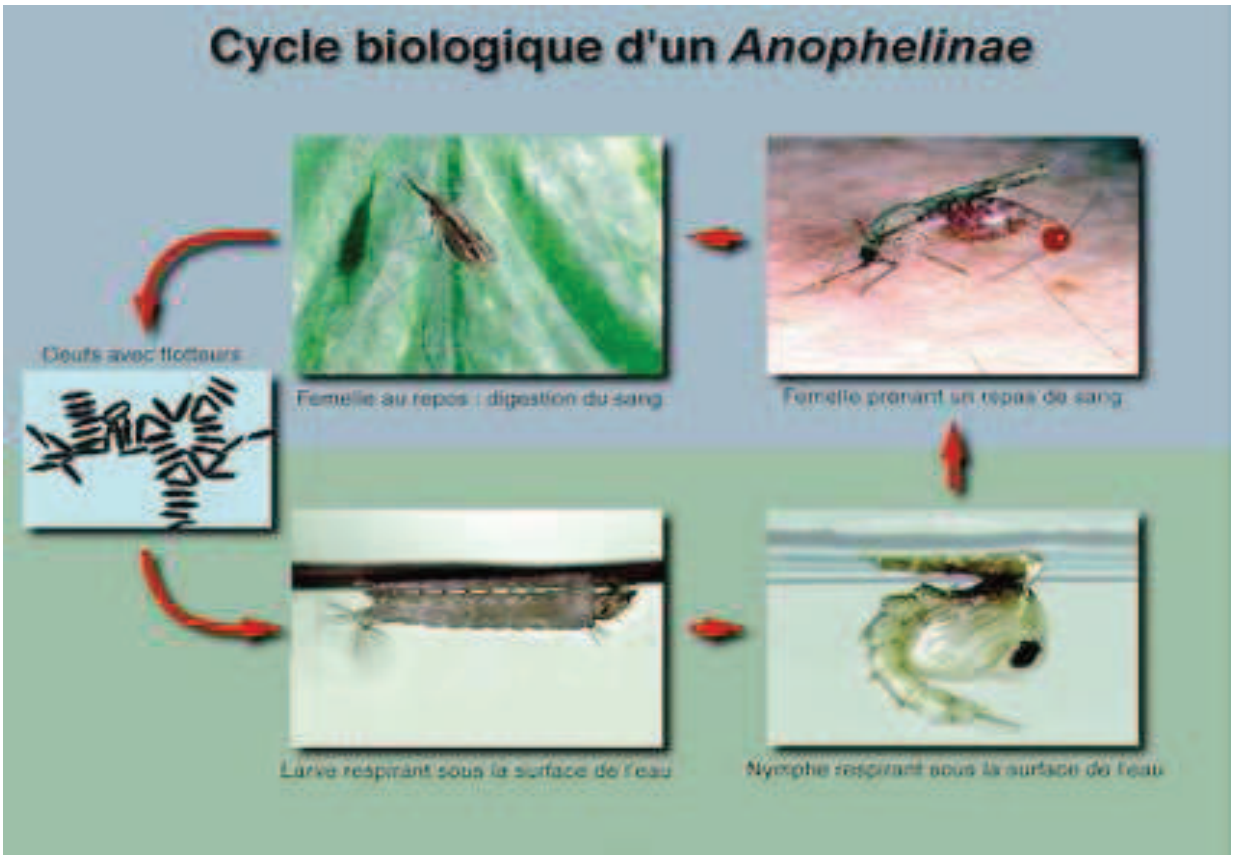
An. nili est très largement répandue dans toute l'Afrique et est localisée aux environs des cours d'eau permanents ou semi-permanents dans lesquels se développent ses larves. Cette

espèce pique volontier l'Homme. L'activité de piqûre se manifeste assez rapidement après la tombée de la nuit et présente un pic plus précoce que ceux (entre 0h et 5h) d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*, mais *An. nili* est nettement plus exophage et exophile que ces deux derniers.

An. moucheti, quant à elle, est limitée au bloc forestier d'Afrique centrale et aux galeries forestières qui le prolongent au nord et surtout au sud. Les adultes sont très anthropophiles, surtout que la présence du bétail est très rare en forêt. Ils sont également très endophiles. Ils restent dans les maisons des villages riverains et peuvent faire des trajets de 3 km entre le village et le lieu de ponte.

I-2-5-2- Cycle de développement des anophèles

Comme toutes les espèces de moustique, les anophèles sont des insectes holométaboles, c'est à dire à métamorphose complète. Leur développement est caractérisé par la succession de deux phases (Robert *et al.*, 1998b) : une première aquatique qui recouvre la vie pré-imaginale, c'est-à-dire l'œuf, les stades larvaires et la nymphe et une seconde aérienne qui concerne l'adulte, ou imago (**Figure 12**).



Source : J. Brunhes et Coll., Les anophèles de la région afro-tropicale, logiciel ORSTOM Ed., 1998

Figure 12 : Cycle biologique d'un anophèle

- **La phase aquatique**

Les anophèles femelles pondent sur l'eau des œufs fécondés. Ces derniers, pondus isolément, sont munis de flotteurs et restent en surface durant l'embryogénèse. De chaque œuf éclot une seule larve d'environ 1 mm. Les larves d'*An. gambiae* et *An. arabiensis* se développent de préférence dans les eaux douces, peu chargées en matière organique, peu profondes, calmes, ensoleillées et sans végétation (Pages *et al.*, 2007) : flaques résiduelles des cours d'eau en décrue, marécages, rizières, petites mares. On retrouve aussi des gîtes anthropiques tels que les surfaces irriguées, les barrages et les fosses. *An. arabiensis* peut aussi s'adapter aux eaux polluées des grandes villes de l'Afrique occidentale (Pages *et al.*, 2007). Les *An. gambiae* « S » se développent préférentiellement dans des gîtes larvaires typiques et temporaires alors que les *An. gambiae* « M » se retrouvent majoritairement dans les gîtes anthropiques semi-permanents ou permanents (della Torre *et al.*, 2001; Favia *et al.*, 1997).

Gîtes *An. gambiae* - Photo Pages F. (IMTSS)

Gîtes *An funestus* – Photo Couhet A. (IRD)

Figure 13 : Exemples de gîtes larvaires d'anophèles

An. funestus a ses gîtes larvaires dans les eaux plus ou moins permanentes avec une végétation herbeuse et ombragée.

Les gîtes larvaires d'*An. moucheti* se situent dans les rivières de toutes tailles à courants lents, au lit souvent encombré par la végétation flottante (*Pistia*, jacinthes d'eau…).

Au terme de sa croissance, la larve de quatrième stade effectue une mue particulière, la nymphose. Cette dernière libère une nymphe aquatique mobile, qui ne se nourrit pas. De profonds remaniements de la morphologie s'effectuent au cours du stade nymphal ménageant ainsi les organes typiques du stade larvaire pour laisser la place aux organes caractéristiques de l'adulte (Robert *et al.*, 1998a).

- **La phase imaginale**

De la nymphe émerge un adulte, mâle ou femelle, qui s'envole rapidement. C'est au cours de la phase aérienne, le plus souvent dans un essaim de mâles réunis au crépuscule, que s'effectue l'insémination de la femelle néonate. Cette dernière ne s'accouple généralement qu'une seule fois dans sa vie. Les spermatozoïdes du mâle sont introduits dans la bourse copulatrice de la femelle, puis ils migrent dans une spermathèque, sorte d'annexe du système sexuel femelle, dans laquelle ils conservent leur pouvoir fécondant pendant plusieurs semaines, jusqu'à la mort de la femelle. La durée de vie d'un anophèle adulte se situe autour de 7 à 10 jours pour les mâles et entre 2 à 8 semaines pour les femelles en région tropicale.

Mâles et femelles se nourrissent de jus sucrés, de nectars et autres exsudats végétaux nécessaires au vol et au métabolisme des moustiques. Le mâle est incapable de perforer la peau d'un vertébré. Seule la femelle est hématophage (Clements and Ferry, 1992) et peut perforer la peau d'un vertébré grâce à ses sylets buccaux tranchants. Un repas sanguin n'est pas indispensable à sa survie, mais il l'est à la maturation ovarienne, comprenant habituellement 150 oeufs chez *An. gambiae*. Le premier repas sanguin est pris entre le 3ème et le 6ème jour, suivant la disponibilité de l'hôte. La fécondation s'effectue dans le tractus génital de la femelle, lors de la ponte, des spermatozoïdes étant libérés à partir de la spermathèque.

I-2-5-3- Le cycle trophogonique des anophèles

Le cycle trophogonique (ou gonotrophique) est la succession des phénomènes physiologiques qui se produisent chez le moustique femelle entre deux repas de sang successifs (Robert and Boudin, 2002). Trois phases sont distinguées : **i)** la recherche de l'hôte et sa piqûre par la femelle à jeûn, **ii)** la digestion du sang qui se déroule dans le même temps que la maturation ovarienne et **iii)** la recherche du lieu de ponte de la femelle gravide.

- **La recherche de l'hôte et la piqûre**

La femelle, à jeun, se met, dans la nuit, à la recherche d'un hôte vertébré à piquer. La localisation de ce dernier se fait à plusieurs niveaux. L'identification des facteurs d'attractivité et des mécanismes de localisation et de reconnaissance de l'hôte à piquer sont des domaines de recherche actuellement en plein essor (Besansky *et al.*, 2004; Costantini and Diallo, 2001; Costantini *et al.*, 1998) : à longue distance, interviennent les stimuli olfactifs tels que des kairomones spécifiques d'espèces animales (ou humaine) ; à moyenne distance, d'autres attractifs interviennent, comme le gaz carbonique émis par la respiration ; et à courte distance,

la chaleur de l'hôte, l'humidité corporelle et divers facteurs visuels pourraient jouer un rôle important.

Pour la piqûre proprement dite, la chaleur relative de l'hôte est un facteur primordial. La piqûre d'un anophèle survient pendant la nuit avec un « intervalle de piqûre » pouvant se répartir du crépuscule jusqu'à l'aurore. Cette activité de recherche de l'hôte et de piqûre est maximale de 0h à 4h du matin. La plupart du temps, la piqûre d'un anophèle est réalisée sur un Homme endormi, contrairement à celle d'autres espèces de moustiques telles que les *Aedes* piquant pendant la journée et de nombreuses fois la même personne ou des personnes différentes avant d'avoir ingéré un repas complet. Lors de la piqûre, le sang est ingéré par pompage après canulation directe d'un capillaire sanguin. La salive est éjectée pendant toute la durée de la piqûre, depuis le début de la pénétration des pièces buccales jusqu'à la réplétion complète de l'estomac de l'insecte. La transmission du parasite se fait par la salive, au moment de la piqûre et au cours du repas sanguin.

- **La digestion du sang et la maturation ovarienne**

Dès la fin du repas commence la digestion du sang qui dure généralement une quarantaine d'heures. Simultanément, les ovaires se développent. Les femelles pares ont besoin d'un seul repas de sang pour élaborer complètement une ponte. Les femelles nullipares ont parfois besoin de deux repas de sang pour achever le développement ovarien ; on dit alors qu'elles présentent un stade pré-gravide.

- **La recherche du lieu de ponte et la ponte**

Dès que la ponte est mature, la femelle se met en quête de gîtes favorables (Le Menach *et al.*, 2005). Comme pour la recherche de l'hôte à piquer, des stimuli olfactifs sont perçus à distance par la femelle et lui permettent de localiser les potentielles gîtes de ponte. Cette dernière a généralement lieu peu après le crépuscule et marque le début d'un nouveau cycle.

La durée du cycle trophogonique est bien connue pour les vecteurs d'Afrique tropicale : elle varie entre deux et trois jours pour les femelles pares, suivant les espèces et les saisons. Pour les nullipares, il est plus long, jusqu'à cinq jours, du fait de la phase pré-gravide.

I-2-6- Faciès et strates épidémiologiques du paludisme

Tous les hommes sont réceptifs aux *Plasmodium* humains, mais les Mélano-Africains sont réfractaires à *P. vivax*. Le facteur limitant de la distribution de la maladie dans le monde concerne la transmission du parasite d'Homme à Homme, et donc les vecteurs qui constituent

le pivot de l'épidémiologie du paludisme (Mouchet *et al.*, 2004). La distribution des vecteurs principaux et secondaires et des espèces plamodiales étant très hétérogène (voire chapitre **I-2-5-1**), la transmission et donc l'endémicité du paludisme est très variable entre zones, régions ou blocs biogéographiques. Ainsi, la classification des zones d'endémie palustre a d'abord été basée sur l'indice splénique (IS) des enfants de 2 à 9 ans, puis sur l'indice parasitaire (IP) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Classification des zones d'endémie d'après Metselaar & Van Thiel (Mouchet *et al.,* 2004)

	Holo-endémique	Hyper-endémique	Méso-endémique	Hypo-endémique et épidémique
Indice splénique (Kampala 1950)	Toujours > 75% réduction des splénomégalies à partir de 10 ans	Toujours > 50% chez enfants de 2 à 9 ans	De 11 à 50% chez enfants de 2 à 9 ans	Moins de 10% chez enfants de 2 à 9 ans
Indice parasitaire (Yaoundé 1960)	Toujours > 75% chez enfants de 6 à 11 ans. Diminution de la densité parasitaire de 2 à 9 ans, plus lente au-dessus de 10 ans	Toujours > 50% chez enfants de 2 à 9 ans	De 11 à 50% chez enfants de 2 à 9 ans	Moins de 10% chez enfants de 2 à 9 ans mais pouvant augmenter à certaines saisons et lors des épidémies

Ces classifications avaient perdu leur intérêt puisqu'elles étaient basées sur un seul paramètre et ne tenaient pas en compte ni le développement de l'immunité avec l'âge, ni la composante vectorielle de l'épidémiologie palustre (Carnevale and Mouchet, 1980). De plus elles ne rendaient pas compte de l'importance de la maladie en Afrique où une grande partie des sujets sont asymptomatiques. De plus, la notion de réduction de la rate ou de la parasitémie, critères réservés à l'holo-endémicité et l'hyper-endémicité, est, en Afrique, valable pour l'hypo-endémicité ou pour la méso-endémicité. Leur révision et amélioration s'avéraient alors imminentes. Ceci avait incité certains auteurs à introduire la notion de **faciès épidémiologiques** (Carnevale *et al.*, 1984) destinée à traduire la dynamique de la transmission en fonction des variations du biotope, à travers un gradient de diversité. Un faciès est un ensemble de lieux dans lesquels le paludisme présente les mêmes caractéristiques de transmission, de développement de l'immunité (de prémunition) et de manifestations pathologiques (Mouchet *et al.*, 2004). C'est ainsi qu'une classification des zones d'endémie en Afrique, en Amérique du Sud, en Asie du Sud-Est etc. a pu être proposée en fonction des données disponibles (Mouchet *et al.*, 2004). En Afrique, les faciès ont pu être groupés en 6

strates épidémiologiques regroupant les grandes régions naturelles ; puisque ce sont le climat, la végétation et la faune anophélienne qui modulent la transmission et déterminent la prévalence parasitaire et l'expression clinique de la maladie (**Figure 14** : (Mouchet *et al.*, 2004).

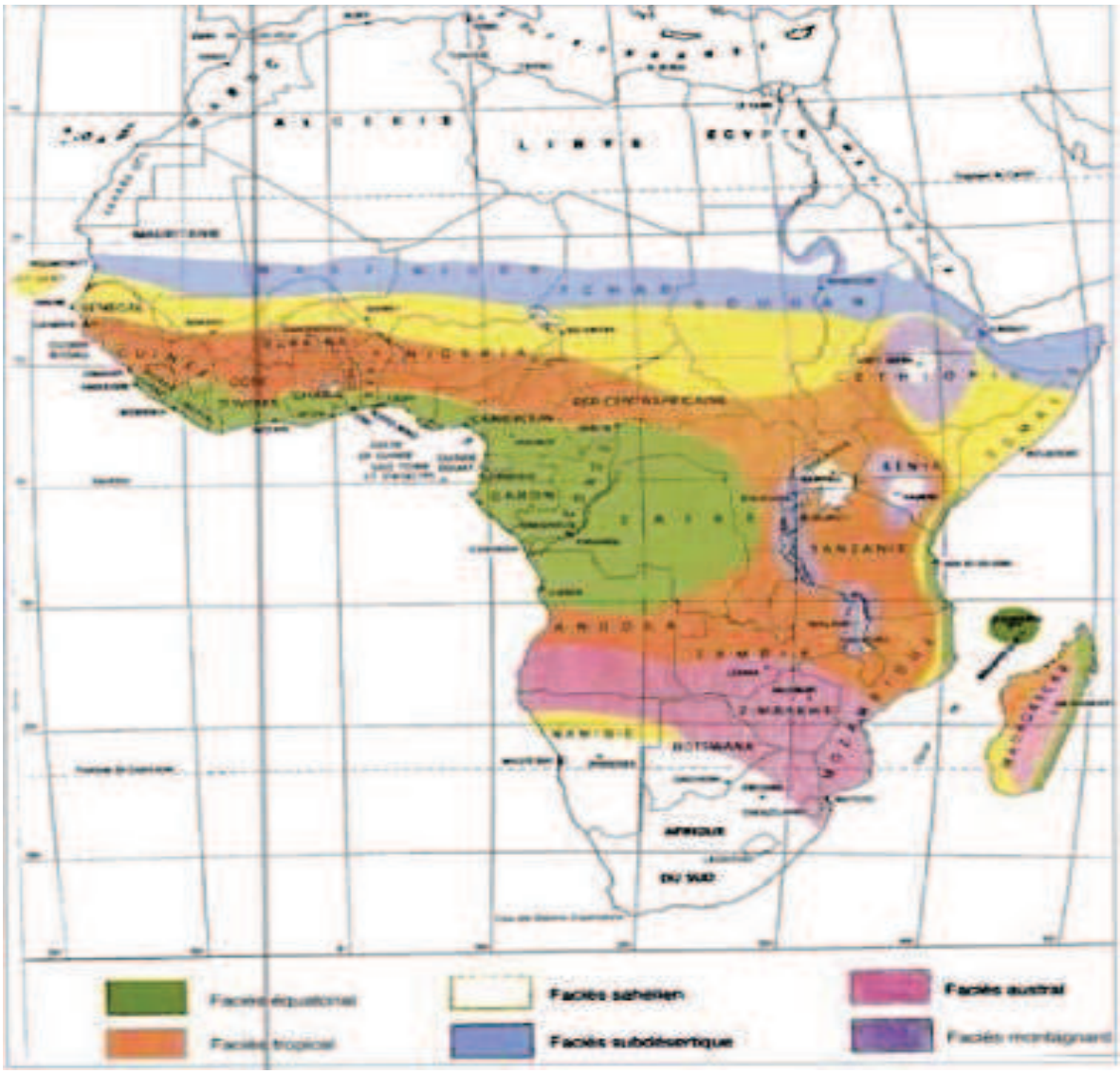


Figure 14 : Faciès épidémiologique du paludisme dans la région Afrotropicale. D'après (Mouchet *et al.*, 2004)

La strate équatoriale recouvre les forêts et savanes post-forestières d'Afrique centrale et d'Afrique occidentale, depuis l'Ouganda jusqu'en Sierra Léone. Le climat est tétraorique avec deux saisons sèches et deux saisons des pluies. Le principal vecteur du paludisme humain est *An. gambiae* s.s. (forme « forêt ») qui se développe dans les clairières et dans les régions déforestées. *An. moucheti* qui se développe dans les cours d'eau du massif centrafricain et *An.*

nili dans les cours d'eau rapides jouent aussi un rôle non négligeable dans la transmission du paludisme humain. La transmission est permanente et le nombre de piqûres infectantes peut atteindre 1000 par an et par personne. Plus de 80% des enfants sont porteurs de parasites. La plupart des accès graves surviennent avant 5 ans et surtout entre 6 mois et 2 ans. La prémunition se développe progressivement jusqu'à 10 ans puis l'incidence des accès graves diminue mais les densités parasitaires ne chutent réellement qu'à partir de 15 ans.

La strate tropicale prolonge au nord, à l'est et au sud, la strate équatoriale. Les deux saisons pluvieuses se concentrent en une seule qui contraste avec une saison sèche bien marquée de moins de 6 mois. Les vecteurs essentiels sont *An. gambie s.s*., *An. arabiensis* et *An. funestus* ; *An. nili* est très localisé. Le nombre de piqûres infectées reçues par homme et par an est du même ordre que dans la strate équatoriale, mais ces piqûres sont groupées sur une saison au lieu d'être réparties sur toute l'année. La prévalence du paludisme chez les enfants varie de 30%, en saison sèche, à 80% pendant les pluies. Elle diminue également de façon significative chez les enfants au-dessus de 15 ans. La morbidité palustre est comparable à celle observée en zone équatoriale. Cependant la mortalité est plus élevée qu'en zone équatoriale (Molineaux, 1997) et affecte surtout les enfants de moins de 4 ans. La prémunition est établie vers 10 ans, mais les accès sont fréquents chez les grands enfants (entre 10 et 15 ans).

La strate sahélienne et subdésertique s'étend du 13e au 20e de latitude nord au niveau du Sénégal, du 7e au 16e degré au niveau de la République Centreafricaine et du Soudan et dans la corne de l'Afrique (Erythrée, Somalie, Sud Ethiopie, Nord Kenya). *An. arabiensis* et *An. gambiae s.s.* sont les seuls vecteurs impliqués dans la transmission du paludisme. La prévalence des parasites dans cette région est très variable et peut atteindre 50% chez les enfants en fin de saison pluvieuse. Le maintien du parasite pendant 8 mois et plus de saison sèche sans transmission constitue une énigme (Gazin *et al.*, 1988).

La strate australe regroupe les zones de végétation recouvrant le cône sud de l'Afrique. Ces régions présentent un climat dégradé et sont constituées de plateaux de 1000 à 2000 m d'altitude, entaillés par les vallées du Zambèze et de la Limpopo. *An. arabiensis* et *An. funestus* y sont les principaux vecteurs du paludisme. Le paludisme y est instable et marqué par des épisodes épidémiques qui suivent les périodes de sécheresse.

Par ailleurs il est possible de rencontrer d'autres types de strates ou faciès plus ou moins localisées :

- **les strates montagnardes** regroupent les régions de 1400 à 2000 m d'altitude dans lesquelles le paludisme est concentré dans les vallées. Le paludisme y est très instable et variable d'une région à une autre suivant le relief, la végétation et les cultures.
- **les faciès locaux ou anthropiques** regroupent toutes les formations particulières, naturelles ou anthropiques (reliefs, sols, réseau hydrographique et modifications anthropiques de l'environnement).

La connaissance des caractéristiques épidémiologiques de la zone est bénéfique à la lutte contre le paludisme. Elle permet de cibler les stratégies de lutte les mieux adaptées au contexte épidémiologique local et donc de mieux faire face au paludisme (WHO, 2006c).

I-3- Les moyens de lutte contre le paludisme

I-3-1- Historique de la lutte antipaludique (Mouchet *et al.*, 2004)

La première méthode de prévention du paludisme remonte à Hippocrate qui conseillait de construire les villages près des ruisseaux et loin des marais pour éviter les fièvres. La première thérapie contre les « fièvres » fut l'utilisation de l'écorce de quinquina de laquelle fut extraite par Pelletier et Caventou en 1820 la quinine qui permit de guérir les fièvres et de protéger les habitants et voyageurs contre elles. A l'autre côté de la planète, les chinois utilisaient le Quinghaosu déjà depuis plus de 2000 ans.

Les découvertes, à la fin du XIXème siècle, de l'agent pathogène et de son mode de transmission changèrent l'attitude de la communauté médicale vis-à-vis du paludisme. On pouvait dès lors, en plus d'avoir un traitement curatif et préventif (la quinine), identifier le parasite et supprimer la transmission de la maladie en éliminant son vecteur.

A partir de 1887, la lutte anti-vectorielle devenait ainsi le fer de lance de la lutte antipaludique. Elle était basée sur la destruction des gîtes larvaires, surtout par drainage, et des larves par les huiles minérales ou l'acéto-arséniate de cuivre (vert de Paris). Dès 1899, Ross initiait des mesures de lutte anti-larvaire qui s'étaient soldées par des échecs à Freetown (Sierra Léone) en 1900, puis à Ismaila (Egypte) en 1901 ; contrairement à Gorgas et Le Prince qui pratiquèrent une lutte anti-larvaire à grande échelle à Cuba (1899) et à Panama (1904) avec un certain succès.

En Italie, en France, en Albanie, en Algérie et aux Etats-Unis, le drainage et l'aménagement de l'environnement et une « quininisation » très importante de la population entraînèrent un net déclin du paludisme et même son élimination dans certaines zones. La lutte contre les moustiques adultes fut utilisée pour la première fois en 1935 à travers des pulvérisations hebdomadaires de pyréthrines en Afrique du Sud. Le DDT, découvert en 1938, remplaça les pyréthrines dans les pulvérisations en 1943 et fut utilisé dans de très nombreux pays impaludés lors de campagnes d'aspersions intradomiciliaires.

Entre le début du XVIIIe et le milieu du XIXe siècle, le paludisme avait spontanément régressé, dans la plupart des régions tempérées de l'hémisphère Nord sauf en Italie, en Corse (France), en Grèce, dans les Balkans, en Hollande et en Allemagne, aux USA et en URSS. Il sévissait à fortiori dans les régions tropicales et subtropicales. Cette régression spontanée fut attribuée au développement économique, à l'amélioration de l'habitat et à la séparation des locaux d'habitation de ceux de stabulation du bétail. Mais cette dernière méthode aurait été à l'origine d'épidémies de 1921 à 1935 en URSS. De ce fait, l'interposition du bétail entre les gîtes larvaires et les habitations pour détourner les anophèles vers les animaux a été appréciée surtout en Europe orientale.

En Afrique tropicale, en Asie du Sud-Est, en Australie et Amérique du Sud, la lutte antipaludique se limitait souvent aux distributions de quinine aux colons européens et aux classes privilégiées, moins fréquemment dans la population autochtone. Ainsi, l'endémie palustre ne changea presque pas dans les pays tropicaux jusqu'en 1945 sauf en Afrique du Sud où venait d'être innovée une lutte imagocide par les pyréthrines (de Meillon, 1936) et le succès obtenu dans l'élimination d'*An. gambie* au Brésil (Soper et Wilson, 1943) et en Egypte (Shousha, 1948)

I-3-2- Les méthodes de lutte antipaludique

Actuellement, la lutte contre le paludisme repose sur 2 aspects majeurs : la lutte contre le parasite par des mesures curatives et préventives et celle contre le vecteur visant à diminuer les densités des populations de moustiques et le contact Homme-Vecteur.

I-3-2-1- Lutte contre le parasite

Cette forme de lutte se base sur un diagnostic précoce, une chimiothérapie rapide et efficace et une chimioprophylaxie qui sont aujourd'hui les moyens de lutte de choix mais la résistance des parasites aux médicaments antipaludiques tend à se généraliser dans les pays endémiques.

Le diagnostic

Il est préalable au traitement. Il doit se faire de façon précoce et fiable afin de limiter le plus vite possible les dommages causés par la maladie (morbidité et mortalité) et l'émergence et la distribution des gènes de résistance aux médicaments utilisés pour le traitement. Il se fait par différents moyens qui ont été décrits dans le **chapitre I-2-3**.

Le traitement

Pour le traitement médicamenteux du paludisme, diverses molécules antipaludiques sont utilisées. Il s'agit d'antipaludiques traditionnels (chloroquine, méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, amodiaquine, la quinine pour le traitement des cas graves chez jeunes enfants et adultes non immuns, certains antibiotiques…) qui sont des molécules de synthèse. Durant cette dernière décennie, suite au développement des résistances de *P. falciparum* à plusieurs de ces molécules (WHO, 2006b), un nouveau groupe de molécules est de plus en plus utilisé : les dérivés de l'artémisinine, dont les plus connus sont l'artésunate, l'artéméther et le dihydroartémisinine. Ces composés ont une action thérapeutique (baisse de la numération parasitaire et résolution des symptômes) très rapide, une courte demie vie, sont efficaces contre le paludisme à *P. falciparum* poly-chimiorésistant, peu toxiques et bien tolérés par les malades et réduisent le portage de gamétocytes (et peuvent donc réduire la transmission du paludisme) (Adjuik *et al.*, 2004; Nosten and White, 2007; WHO, 2006b). Ils sont utilisés pour le traitement des accès palustres simples (Sinclair *et al.*, 2009; WHO, 2006b). Utilisés seuls, ils permettent une guérison du paludisme à *P. falciparum* en sept jours. De plus, plusieurs études ont démontré que les dérivés de l'artémisinine, combinés à autres médicaments de synthèse (méfloquine, sulfadoxine, pyriméthamine, amodiaquine…) donnent des taux élevés de guérison en 3 jours seulement, avec une adhésion plus élevée au traitement. Selon certaines données, l'utilisation de ces associations pourrait en outre différer sensiblement l'apparition d'une résistance au médicament associé dans les zones de transmission faible à modérée. Une des recommandations de l'OMS est ainsi devenue le traitement par la bithérapie (dérivé artémisinine associé à un médicament de longue durée) (WHO, 2006b). Les combinaisons qui sont le plus couramment utilisées sont : artéméther-lumefantrine, artésunate + amodiaquine, artésunate + méfloquine, artésunate + sulfadoxine-pyriméthamine. Cependant, il faut noter que la bithérapie ne montre toujours pas une efficacité totale, bien qu'elle ait été appliquée avec un certain succès en zone endémique. De plus, des phénomènes de résistance de *P. falciparum* à ces composés (ou plûtot une baisse de sensibilité de *P. falciparum* à ces composés) ont été récemment signalés aux larges de la frontière entre le Cambodge et la

Thailande (Dondorp *et al.*, 2009; Noedl *et al.*, 2009), du fait probablement d'une pression forte des médicaments utilisés souvent en monothérapie (Dondorp *et al.*, 2009).

La chimioprophylaxie

C'est un moyen de prévention de la maladie basé sur l'utilisation de molécules chimiques. Tout comme le traitement, le produit à utiliser varie suivant les pays et les circonstances et donc l'endémicité de la zone, d'où la nécessité de s'informer au près corps médical en place (WHO-Unicef, 2003). Mais d'une manière générale, l'arsenal thérapeutique de la chimioprophylaxie se limite à la chloroquine, au proguanil, à l'association pyriméthamine-dapsone, à la méfloquine et à la doxycycline (WHO-Unicef, 2003). En raison de l'accroissement de la pharmacorésistance parasitaire et des effets secondaires propres aux différents produits, il est de plus en plus difficile d'établir des directives chimioprophylactiques rationnelles (Greenwood *et al.*, 2005). Cette méthode préventive se limite aux voyageurs et, dans certains cas, à des groupes particuliers tels que les femmes enceintes (Greenwood *et al.*, 2005). Chez ces dernières, l'administration à titre prophylactique de la sulphadoxine-pyriméthamine (SP), à chaque consultation anténatale programmée après le premier trimestre de la grossesse, réduit considérablement le risque d'anémie chez la mère, ainsi que l'insuffisance pondérale à la naissance (Vallely *et al.*, 2007). Chez les enfants de moins de 5 ans résidant dans une zone de transmission saisonnière courte du paludisme au Sénégal, l'administration intermittente et systématique de SP + artesunate en trois prises annuelles a entraîné une réduction de 86 % du nombre d'accès palustres (Cisse *et al.*, 2006).

Les stratégies vaccinales

Un vaccin serait un puissant outil préventif et donc de lutte contre le parasite (Tongren *et al.*, 2004). A cet effet, divers types de vaccins ou candidats vaccins ont été développés durant cette dernière décennie (**Figure 15**). Ils dérivent de seulement une vingtaine d'antigènes (WHO, 2006b). Plus d'une dizaine de candidats vaccins sont actuellement en essais cliniques de phase 1, 2 ou 3 (Malkin *et al.*, 2006). Ils ont tous pour cibles les divers antigènes issus des différents stades du cycle parasitaire (Tongren *et al.*, 2004)

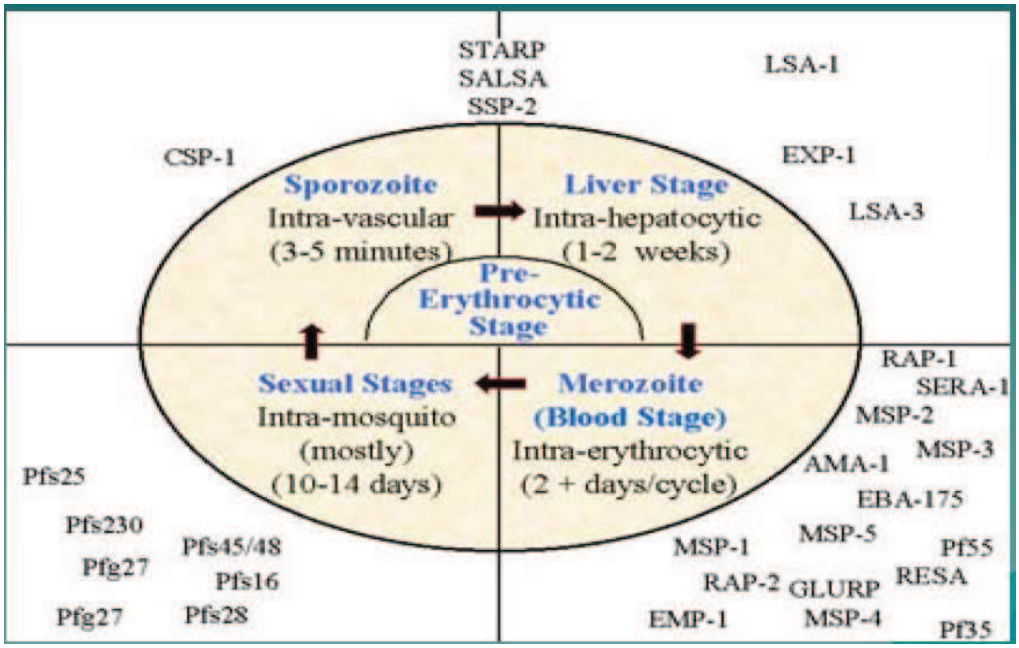


Figure 15 : Représentation schématique des antigènes candidats vaccins

Vaccins anti-stades exo-érythrocytaires

Les vaccins contre les stades pré-érythrocytaires doivent induire des réponses immunes ciblant les sporozoïtes ou les schizontes hépatiques. Le but est d'empêcher toute libération de mérozoïtes dans le sang. Pour induire une immunité chez des individus non immuns, l'efficacité de ce type de vaccin doit être de 100% pour qu'il ait un impact significatif sur l'infection et le développement de la maladie. Le vaccin RTS,S/AS02A (GlaxoSmithKline) qui est probablement le candidat le plus avancé et le plus prometteur appartient à ce groupe. En effet, RTS,S/AS02A s'est avéré sûre et immunogénique dans des études précédentes menées chez des adultes (Doherty *et al.*, 1999) et des enfants en Gambie (Bojang *et al.*, 2005). De plus, les études cliniques menées récemment chez 2000 jeunes enfants mozambicains ont révélé que ce candidat vaccin pouvait réduire près de 50 % des cas graves de paludisme et de 35 % l'infection par *Plasmodium* (Aponte *et al.*, 2007; Macete *et al.*, 2007). Cette protection est associée à une réponse immune protectrice humorale (Ac anti-CSP, CircumSporozoite Protein) et cellulaire (production d'IFN-γ) (Alonso *et al.*, 2005). Il n'est cependant pas certain qu'il ait une efficacité suffisante et assez longue pour justifier son utilité en santé publique (Snounou *et al.*, 2005). Néanmoins, c'est le seul vaccin qui reste le plus prometteur. D'autres vaccins CSP en cours de développement (sporozoïtes irradiés) n'ont pas encore dépassé la phase II (essais en zone endémique) ; aucun n'a donné de meilleur résultat que le RTS,S/AS02A (Hill, 2006).

D'autres candidats vaccins contre les stades pré-érythrocytaires visent à induire une réponse cellulaire T contre les schizontes hépatiques. Ils incluent un ou plusieurs antigènes comme TRAP (Thrombospondin-Related Adhesine Protein), LSA-1 (Liver Stage Antigen-1), LSA3 (Liver Stage Antigen 3), SALSA (Sporozoite And Liver Stage Antigen), STARP (Sporozoite Threonine And Asparagine rich Protein) ou EXP-1 (EXported Antigen-1), et sont administrés sous la forme de protéines recombinantes, de polypeptides synthétiques longs, de particules protéiques, de lipopeptides, ou de vecteurs d'expression plasmidiques ou viraux (vaccins ADN) (Hill, 2006).

Aucun des candidats vaccins contre les stades pré-érythrocytaires n'a atteint l'objectif de 100% de protection contre l'infection. L'intérêt de leur développement repose donc sur leur efficacité éventuelle pour diminuer l'incidence des accès palustres simples et les formes graves de paludisme ou/et leur association avec des antigènes des autres stades du parasite.

Vaccins anti-stades asexués **(anti-mérozoïtes)**

Ils visent à empêcher l'invasion des hématies par les mérozoïtes, et donc à contrôler les densités plasmodiales circulantes, ou l'évolution des infections vers des formes cliniques et potentiellement graves de la maladie.

Les principaux antigènes candidats vaccins ayant atteint le stade des essais cliniques sont MSP-1 (Merozoite Surface Protein-1), MSP-3 (Merozoite Surface Protein-3), AMA-1 (Apical Membrane Antigen-1), EBA-175 (Erythrocyte Binding Antigen) et GLURP (GLUtamate Rich Protein). Les candidats vacins en cours d'études pré-cliniques sont MSP-2 (Merozoite Surface Protein-2), MSP-4 (Merozoite Surface Protein-4), MSP-5 (Merozoite Surface Protein-5), RAP-2 (Rhoptry-Associated Protein), RESA (Ring infected Erythrocyte Surface Antigen), SERA (SErine-Repeat Antigen), PfEMP-1 et une toxine GPI synthétique de *P. falciparum*.

Dans des modèles animaux (murins et primates), il a été montré qu'AMA-1 pouvait induire une réponse immune protectrice contre des infections expérimentales (Anders *et al.*, 1998; Kennedy *et al.*, 2002; Stowers *et al.*, 2001). Différents essais de phase 1 ont été effectués chez l'homme avec des vaccins dérivés de cet antigène (Malkin *et al.*, 2005; Saul *et al.*, 2005). Dans leur ensemble, les résultats obtenus avec ces antigènes suggèrent qu'un certain niveau d'immunité pourrait être acquis par vaccination, mais que seuls les essais d'efficacité en zone d'endémie permettront de savoir si ces vaccins contre des stades sanguins asexués sont capables de protéger contre les accès palustres ou les formes graves du paludisme. L'un des obstacles à la mise au point de ces vaccins est le polymorphisme

allélique des antigènes utilisés. Un essai clinique en Papouasie-Nouvelle Guinée a montré qu'un vaccin ne contenant qu'une seule version des allèles naturellement exprimés par les parasites peut induire une protection contre les parasites portant cet allèle et sélectionner ceux qui ne le portent pas (Genton *et al.*, 2002), limitant ainsi l'importance de l'immunité induite.

La mise au point de tels vaccins se heurte à différents obstacles : les difficultés d'évaluation expérimentale chez l'homme, l'absence de modèle animal pertinent, l'absence de corrélat immunologique de la protection, et la grande variabilité antigénique des différentes souches plasmodiales.

Vaccins bloquant la transmission

Des anticorps dirigés contre des antigènes des stades sexués du parasite peuvent empêcher la fécondation dans l'estomac de l'anophèle et bloquer le développement du parasite chez l'anophèle vecteur. Une vaccination permettant de reproduire ce phénomène serait altruiste. PvS25 pour *P. vivax* et PfS25 pour *P. falciparum* sont les candidats vaccins de ce type dont le développement est le plus avancé. Cet antigène est capable d'induire des réponses anticorps chez la souris, chez des primates non humains et chez l'homme (essai de phase 1) qui bloquent la transmission d'isolats ou de souches à des anophèles se gorgeant artificiellement sur membranes (Arakawa *et al.*, 2005; Arevalo-Herrera *et al.,* 2010; Arevalo-Herrera *et al.*, 2005).

L'efficacité de ce type de vaccin n'a encore jamais été évaluée sur des populations vivant en zone d'endémie (phase 2). De plus, ce type de vaccin, même s'il peut assurer une protection de l'individu, ne permet pas de limiter la transmission des parasites de l'homme au vecteur, et secondairement du vecteur à l'homme, surtout dans les régions africaines où la transmission est très forte et assurée par des vecteurs très compétents.

De tels vaccins ne pourraient donc être utiles que dans les régions de paludisme instable et de transmission naturellement faible, en compléments d'interventions anti-vectorielles, ou en combinaison pour limiter la transmission des parasites échappant à la réponse immune induite par un autre vaccin antipaludique.

Les antigènes variants de surface (AVS)

Ils sont exprimés par les parasites adhérents au placenta (PAP) et sont des candidats prometteurs pour une vaccination spécifique contre le paludisme de la femme enceinte. En effet, l'acquisition lente et progressive de la prémunition est généralement couplée avec la mise en place d'IgG spécifiques à la plupart de nombreux AVS. Ces études ont notamment

permis de comprendre la fréquence et le développement du paludisme chez les femmes primipares. En effet, les jeunes femmes vivant dans les zones d'endémie palustre ne possèdent pas d'IgG spécifiques à des AVS exprimés par les parasites adhérents au placenta (AVS-PAP). A la suite de l'exposition aux AVS-PAP, des IgG spécifiques sont rapidement produits, ce qui est cohérent avec la diminution de la susceptibilité du paludisme de la femme enceinte associé avec l'augmentation du nombre des grossesses.

Il convient toutefois de noter qu'aucun de ces types de vaccin n'a pas encore montré des résultats satisfaisants. L'une des difficultés majeures étant rencontrée au niveau des essais cliniques : la plupart des vaccins n'ont pas montré les effets qu'ils avaient en conditions expérimentales sur des modèles animaux. Ceci est dû à la variation antigénique (au total plus de 5000 antigènes), à la complexité du cycle (4 différents stades de vie), à la diversité des souches de *Plasmodium* et à la faiblesse et labilité de leur immunogénicité (l'immunogénicité induit est faible et disparaît rapidement).

I-3-2-2- La lutte contre le vecteur

Suite aux échecs des programmes de lutte menés entre les années 1930 et 1970, la lutte contre le paludisme, et les maladies à transmission vectorielle en générale, s'oriente, désormais, vers des méthodes visant, non plus à éradiquer les populations d'insectes nuisibles, mais à réduire et à contrôler leurs densités en dessous d'un seuil épidémiologiquement tolérable. Les programmes de lutte sont ainsi menés en tenant compte des particularités épidémiologiques des régions concernées et de la bio-écologie des espèces visées. D'un point de vu épidémiologique, les méthodes de lutte sont classées selon le « maillon » qu'elles ciblent au niveau du cycle de la transmission (Pages *et al.*, 2007). On distingue ainsi les méthodes qui visent principalement à réduire la production de moustique ou augmenter la mortalité des adultes de celles visant à réduire le contact Homme-Vecteur.

La réduction de la densité des moustiques peut se faire à deux niveaux en rapport avec les stades de développement du vecteur (Darriet, 1998), à savoir la lutte contre les larves et contre les adultes ou imagos.

a- La lutte contre les larves

Elle requiert une bonne connaissance de la biologie du vecteur (conditions, lieu, période de développement...). Elle peut se faire par :

- par l'aménagement de l'environnement : assainissement autour des habitations (protection individuelle et familiale) ou irrigations intermittentes.
- une lutte chimique : traitement larvicide des eaux de surface (ecdysoïdes tels que le triflumuron et des juvénoïdes). Les larvicides doivent être sélectives et leur efficacité et rémanence évaluées sur le terrain avant d'être appliquées (Darriet, 1998).
- une lutte biologique : introduction de prédateurs, parasites ou de bactéries entomopathogènes des larves du vecteur (Louis and Albert, 1988; Mittal, 2003).
- une lutte génétique : réduction de la densité des populations de moustiques par modification de leur patrimoine génétique ou par leur autodestruction (Alphey *et al.*, 2002; Alphey *et al.*; Alphey *et al.*, 2007; Catteruccia *et al.*, 2009).

La lutte anti-larvaire n'est efficace que si les gîtes larvaires sont limités en nombre, facilement identifiables et faciles d'accès. Ce qui n'est généralement pas le cas surtout pour les vecteurs principaux du paludisme en Afrique.

b- La lutte contre les adultes

Du point de vue épidémiologique, il est préférable de classer les méthodes de lutte selon le « maillon » qu'elles affectent au niveau du cycle de transmission. En effet, certaines méthodes visent principalement à réduire la production de moustiques ou à augmenter la mortalité des adultes tandis que d'autres visent à réduire le contact Homme-Vecteur.

b-1- Réduction des densités de moustiques

En faisant disparaître par destruction massive ou en limitant les populations anophéliennes à des densités très basses, cette méthode favorise sans doute la diminution du taux d'inoculation du parasite et donc la transmission de la maladie en ce sens que le nombre de piqûres (et donc de piqûres infectantes) sera réduit. Elle peut se faire de deux manières :
- généralement par **l'utilisation d'insecticides à effet rémanent lors des programmes d'aspersions intra-domiciliaires (AID)**. Leur efficacité n'a été montrée que quand elles portent sur un vaste espace. De nombreux types d'insecticides appartenant à 3 grands groupes de composés chimiques (organochlorés, organophosphorés et carbamates) ont été utilisés pour ces types d'actions depuis longtemps.

Cette technique est encore utilisée en Afrique contre les vecteurs endophiles et endophages du paludisme comme *An. funestus* et *An. gambiae*. Cependant, elle n'élimine pas les vecteurs exophiles et exophages et a montré beaucoup de limites (Darriet, 1998). De plus, la toxicité des insecticides utilisés sur l'environnement pose problème. En effet, certains de

ces composés (organophosphorés et carbamates) ont montré une trop grande persistance dans les milieux naturels et peuvent entraîner le phénomène de bioaccumulation. D'autres, à l'image du DDT (organochloré), se sont montrés très toxiques aussi bien pour les invertébrés que pour les vertébrés. Le DDT est le plus connu des insecticides et le premier à être utilisé durant les années 1950. Il a fortement contribué à l'éradication totale du paludisme en Europe, en Amérique du Nord, au Japon, etc. Mais il a été rapidement abandonné du fait de son effet toxique et donc des énormes dommages causés à l'environnement, à court comme à long terme. Cependant, il est actuellement en réutilisation en aspersions intra-domiciliaires dans plus de 99 pays avec une grande surveillance. Est venue ensuite la découverte des pyréthrinoïdes (vers 1970) de synthèse qui dérivent de pyréthrinoïdes naturelles. L'utilisation de ces composés (la lamda-cyalothrine, la perméthrine et la deltaméthrine par exemple) est encouragée vivement du fait de leur faible toxicité pour les mammifères (et donc sur l'environnement) et leur rémanence prolongée.

De nos jours des insecticides moins toxiques pour l'environnement et efficaces comme certains organophosphorés (malathion), carbamates (bendiocard) ou pyréthrinoïdes sont actuellement recommandés (WHO, 2006a).

- mais aussi par les **pulvérisations spatiales de pyréthrinoïdes ou d'organophosphorés**. Cette technique définie comme la destruction des moustiques en vol par contact avec les insecticides en l'air, a une faible activité résiduelle et un coût élevé. Son utilisation doit donc être réservée aux situations épidémiques.

Les aspersions intra-domiciliaires et les pulvérisations spatiales d'insecticides sont des mesures de lutte contre les moustiques adultes applicables à de vastes zones géographiques, contrairement à celles plus spécifiques et plus localisées de la lutte anti-larvaire.

b-2- Réduction du contact homme-vecteur

Les moustiquaires imprégnées d'insecticide (Figure 16)

Depuis la célèbre expérience de *Grassi* durant l'été 1900 (Trape, 2000), il est établi que des mesures simples de protection contre les piqûres d'anophèles permettent d'éviter l'infection palustre même en zone d'endémie. Préconisée par tous les traités de médecine tropicale depuis le début du 20ème siècle, l'utilisation de moustiquaires représente non seulement une source individuelle de protection de base contre le paludisme, mais aussi contre d'autres vecteurs arthropodes (*Culex*) et les nuisances qu'ils causent (Hougard *et al.*, 2002).

Figure 16 : Un homme en train d'installer une moustiquaire au dessus de son lit.

Les moustiquaires imprégnées (de DDT) ont été utilisées pour la première fois durant la 2nde guerre mondiale par les armées allemande, russe et américaine. L'OMS approuve au début des années 1980 l'utilisation des pyréthrinoïdes comme produit d'imprégnation des moustiquaires et la perméthrine en particulier. Diverses études ont montré que l'imprégnation des moustiquaires, en plus de l'effet de barrière physique qu'elles confèrent quand elles sont non traitées (Snow, 1987), réduit sensiblement la transmission du paludisme (Carnevale *et al.*, 1991; Darriet, 1998a; De La Cruz *et al.*, 2006). En effet, l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MIIs) dans une communauté entraîne, en plus de la protection individuelle du fait d'une baisse de piqûres reçues individuellement, une mortalité à grande échelle des populations de moustiques dans les régions où les vecteurs sont très anthropophiles. Leur usage généralisé réduit les populations de vecteurs et diminue la durée de vie moyenne des moustiques (Magesa *et al.*, 1991). Il en résulte une diminution du taux d'infestation par les sporozoïtes car peu de moustiques survivent suffisamment longtemps pour que le cycle puisse se dérouler. De plus, les MIIs empêchent les moustiques de se nourrir, ce qui réduit le potentiel reproducteur des espèces très anthropophiles.

Plus d'une vingtaine d'études réalisées sur les MIIs dans différentes régions du monde rapportent une réduction de 20 à 63% des cas de paludisme et de la mortalité qui lui est associée (Alonso *et al.*, 1991a; Alonso *et al.*, 1991b; Snow *et al.*, 1996). Ces résultats sont par

la suite confirmés par des études menées au Ghana (Binka *et al.*, 1996) et au Kenya (Nevill *et al.*, 1996) qui ont indiqué qu'au moins 500.000 enfants africains pourraient être sauvés chaque année si la distribution et l'utilisation à grande échelle des moustiquaires imprégnées étaient efficaces. Elles sont de ce fait adoptées comme une importante méthode de lutte contre le paludisme. Cependant, les MIIs sont confrontées à un certain nombre de limites éthiques, socio-économiques et culturelles dans leur utilisation, limitant ainsi leur acceptabilité. Pour qu'elles puissent être acceptées par les communautés, **(i)** il faut qu'elles protègent efficacement contre d'autres insectes nuisants tels que les *Culex*, les punaises ou les blattes (Lines, 1996), **(ii)** que leur prix soit accessible à l'ensemble de la population, et **(iii)** qu'il n'ait pas un besoin de les réimprégner (Lines, 1996). C'est pourquoi, depuis une dizaine d'années, des moustiquaires à « longue durée d'action » ou « long lasting insecticide nets (LLINs) » sont disponibles sur le marché et présentent l'avantage de ne nécessité aucun retraitement durant leur durée de vie estimée entre 3 et 5 ans (Guillet *et al.*, 2001).

Mais, le développement des phénomènes de résistance des anophèles aux insecticides d'imprégnation (Chandre *et al.*, 1999) et leur influence supposée négative sur l'immunité anti-paludisme chez l'homme (Muller *et al.*, 2006) ont remis en discussion l'efficacité de leur mise en place comme stratégie unique de lutte contre le paludisme. Pour une meilleure gestion des phénomènes de résistances, de nouvelles méthodes d'imprégnation ont été mises en place. Il s'agit notamment de la bi-imprégnation (Asidi *et al.*, 2005; Hougard *et al.*, 2002b) et de l'utilisation d'autres insecticides telle que la Bifenthrine (Chouaibou *et al.*, 2006; Hougard *et al.*, 2002b).

Les MIIs, comme les aspersions intra-domicilaires, peuvent être donc vues comme un moyen de lutte anti-vectorielle à application générale (WHO-Unicef, 2003).

Rideaux imprégnés

L'utilisation des rideaux imprégnés peut également constituer une méthode de lutte complémentaire aux MIIs. Au Burkina Faso, les rideaux imprégnés de perméthrine ont permis de réduire significativement la transmission du paludisme (Pietra *et al.*, 1991) contrairement aux résultats mitigés obtenus dans les hauts plateaux de Madagascar (Rabarison *et al.*, 1995)

Autres méthodes de réduction du contact Homme-Vecteur

Des outils complémentaires de protection individuelle sont disponibles et largement utilisés comme diffuseurs d'insecticides : les bombes insecticides, les serpentins ou les

répulsifs. Ces outils complémentaires peuvent être utiles pour les gens se trouvant à l'extérieur pendant les pics d'activité des vecteurs.

Les répulsifs

Un répulsif se compose d'une substance active (naturelle ou synthétique) et de différents excipients formant une formulation pouvant se présenter sous forme de spray, de lotion de crèmes ou de lingettes. Il existe de nombreux produits sur le marché. Les critères de choix doivent se faire selon la substance active, son dosage, l'âge des utilisateurs et selon l'état physiologique (grossesse, allaitement…). Actuellement, seuls les produits utilisant comme principe actif un des 3 répulsifs de synthèse (le citriodiol, l'IR 3535 et le diéthyl toluamide ou DEET) sont utilisables en France (Pages *et al.*, 2007). Pour l'enfant de moins de 30 mois, aucun produit répulsif n'est recommandé et l'accent doit être mis sur les autres moyens de protection tels que les moustiquaires de lit.

La durée de la protection par un répulsif varie de 6 à 12 heures selon la substance active, la formulation et la température extérieure.

Les bombes aérosols

Ils sont très utilisés dans les pays en voie de développement et se composent essentiellement d'insecticides pyréthrinoïdes de 1ère génération (resméthrine, esbiothrine…) à action rapide et fort effet Knock-Down (mortalité ou inactivité de l'insecte au contact avec l'insecticide) ou des carbamates (propoxur).

Les tortillons fumigènes

Ils sont aussi très utilisés dans les pays en voie de développement du fait qu'ils sont accessibles et à bon marché. Une fois allumés, ils brûlent lentement et régulièrement et diffusent de l'insecticide qui tue ou tient les moustiques à distance par un effet aérien. Toutefois, de grandes différences sont observées entre les différents produits (pyréthrine ou pyrèthre, alléthrine ou transalléthrine).

I-3-2-3- Le concept de lutte intégré

Les caractéristiques de la transmission et de l'épidémiologie du paludisme varient beaucoup entre régions, pays, et même au sein d'un même pays. De ce fait, une seule stratégie de lutte donnée n'est pas applicable dans tous les contextes épidémiologiques et sa mise en place devient cruciale : elle doit tenir compte des caractéristiques épidémiologiques de la zone

concernée (Takken and Knols, 2009). Ces dernières, sous l'emprise de plusieurs facteurs, sont : **(i)** des caractéristiques biologiques, anthropologiques, culturelles et sociales de la population de la zone, **(ii)** l'intensité et la durée de la transmission du paludisme, **(iii)** les espèces plasmodiales et leur degré de sensibilité aux médicaments antipaludiques, **(iv)** les espèces d'anophèles, leur comportements trophiques et leur successibilité aux insecticides, **(v)** l'existence de changements sociaux et environnementaux, et les caractéristiques des services de santé de la zone. Une stratégie de lutte qui tient en compte l'ensemble des caractéristiques épidémiologiques d'une zone peut permettre l'application, de façon complémentaire, de toutes ou d'une partie des outils de lutte contre le paludisme disponibles (Nyarango *et al.*, 2006) : c'est le **concept de « lutte intégrée »**. L'application à grande échelle de mesures simples de lutte a permis d'éliminer ou de réduire drastiquement le poids du paludisme dans certaines zones d'endémie (Greenwood and Targett, 2009). Au Vietnam (Asie du Sud-Est), la mise en place de programmes effectifs de traitement (basés sur les ACTs) et le déploiement massif de MIIs a permis de contrôler le paludisme dans les zones à risque (Erhart *et al.*, 2007). En Afrique, des succès ont été notés dans la réduction de la morbidité et mortalité palustres dans certains pays (Tanzanie, Erythrée, Kenya, Rwanda, Sud Mozambique, Zambie, Afrique du Sud, Sénégal, Gambie et Guinée Bissau) suite à des combinaisons de méthodes de lutte (Bhattarai *et al.*, 2007; Ceesay *et al.*, 2008; Nyarango *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2008; Sharp *et al.*, 2007). La mise en place aux Etats-Unis de combinaisons de stratégies de lutte anti-vectorielle, pour protéger la population humaine des piqûres et nuisances des moustiques vecteurs, avait permis de réduire la transmission de la plupart des maladies transmises par des moustiques (Challet, 1991). En zone d'endémie palustre, de nombreuses études, combinant l'utilisation des MIIs aux aspersions intradomiciliaires, ont rapporté une baise supérieure ou égale à 90% de la transmission du paludisme. Cette baisse était couplée dans la plupart des cas à une forte réduction de l'incidence du paludisme, de la prévalence et des densités parasitaires, des cas de paludisme simples ou graves (Gu and Novak, 2005; Nyarango *et al.*, 2006; Protopopoff *et al.*, 2007). La mise en place de cette approche nécessiterait cependant un bon monitoring incluant plusieurs éléments et secteurs sanitaires, gouvernementaux et non gouvernementaux (Beier *et al.*, 2008). La **figure 17** représente un exemple de monitoring et de prise de décision proposé par Takken and Knols (2009)

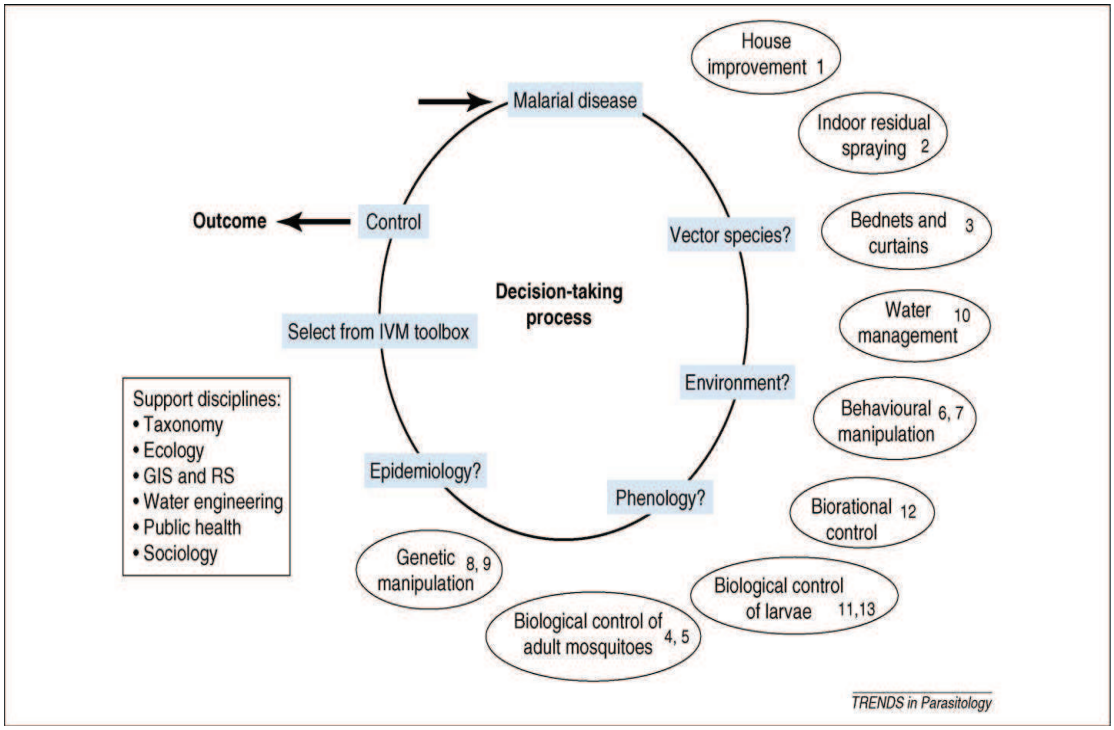


Figure 17 : Charte décisionnelle pour le monitoring de la lutte intégrée contre le paludisme d'après (Takken and Knols, 2009)

Les méthodes de lutte visant à détruire les vecteurs ou à réduire leur contact avec l'homme vont directement entraîner une réduction des taux de piqûres, et donc de la transmission. Les méthodes visant les parasites (médicaments et vaccin peut être!) couplée avec les approches sérologiques sont essentielles pour l'éradication du paludisme et peuvent compléter les méthodes de lutte anti-vectorielle choisies. Ceci est illustré par un récent succès à Zanzibar (Tanzanie) où la combinaison de MIIs, aspersions intra-domiciliaires et d'ACTs a permis d'élimer complètement le paludisme dans cette zone où la transmission était très forte (Bhattarai *et al.*, 2007).

De plus la lutte intégrée serait beaucoup moins coûteuse et plus accessible que les recherches de nouveaux médicaments ou insecticides efficaces (Greenwood, 2008 and 2009; Takken and Knols, 2009).

CHAPITRE II

METHODES D'EVALUATION ACTUELLES DE LA LUTTE ANTIPALUDIQUE ET LEURS LIMITES

Le déploiement des moyens de lutte contre le paludisme dans les zones à risque (essais en phase 3 et 4) a abouti à une réduction du poids de la maladie dans certaines de ces zones (Greenwood and Targett, 2009; Takken and Knols, 2009) de telle sorte que l'objectif d'éradication, encore tabou il y a quelques années, revient sur le devant de la scène. Si la technologie et les moyens de lutte contre le paludisme ont connu des développements importants, des enseignements du programme d'éradication mené au milieu du vingtième siècle (années 50-70) ont peut-être été oubliés (Rogier *et al.*, 2009b). Quelle que soit la méthode de lutte, son efficacité doit être évaluée et surveillée de manière précise afin de savoir si elle permettra d'éliminer ou seulement de contrôler le paludisme dans les zones où elle sera appliquée systématiquement (Rogier *et al.*, 2009b). L'efficacité « théorique » (« efficacy » des anglais) ou l'efficacité « réelle » (« effectiveness » des anglais) d'une méthode de lutte est mesurée par son impact épidémiologique sur le paludisme chez l'homme ou/et par des paramètres entomologiques associés à la transmission et par l'estimation de son acceptabilité par les communautés cibles (Rogier *et al.*, 2009a).

Dans ce chapitre, en concordance avec la thématique de cette thèse, nous nous sommes focalisés exclusivement sur les méthodes d'évaluation de l'efficacité de la lutte anti-vectorielle, même si elles peuvent être, dans certains cas, communes à d'autres moyens de lutte contre le parasite.

II-1- Acceptabilité et surveillance des effets secondaires

L'acceptabilité d'une méthode de lutte contre les moustiques vecteurs du paludisme (MIIs, aspersions intra-domiciliaires, bombes aérosols, répulsifs, serpentins fumigènes….) facilite son utilisation par la population et est, de ce fait, un facteur déterminant de son efficacité. Elle varie selon les bénéfices qu'en tire la population, le degré d'inconvénient causé, l'investissement en temps et en argent (Rogier *et al.*, 2009a). Son évaluation dès la mise en place de la lutte permet d'évaluer et d'améliorer l'efficacité de la méthode de lutte.

Les données de base sur l'acceptabilité sont récoltées sur un échantillon randomisé de ménages du bras intervention au début de l'intervention, puis régulièrement par des enquêtes transversales. Dans le cadre de l'utilisation des MIIs, à l'aide de questionnaires, les ménages sont interrogés pour évaluer les effets secondaires perçus, qu'ils soient nocifs ou bénéfiques, et les manières d'utiliser les moustiquaires (Thwing *et al.*, 2008). Les taux de possession et d'utilisation des moustiquaires notamment par les populations les plus vulnérables (enfants de moins de 5 ans et femmes enceintes), indicateurs principaux renseignant sur l'acceptabilité

des MIIs par les populations cibles (Malaria, 2005), sont ainsi calculés (Jambulingam *et al.*, 2008).

Les facteurs qui peuvent limiter l'acceptabilité incluent les résidus visibles de l'insecticide sur les murs, une odeur déplaisante ou une irritation cutanée ou nasale provoquée par les produits insecticides (de l'AID ou de la MII), le manque d'air dû aux MIIs (« caractère étouffant des MIIs ») sous les climats chauds et humides,… De plus, l'inexistence de méthodes évaluant le gap qui existe entre la possession et l'utilisation des MIIs rend l'évaluation de leur efficacité réelle par ces enquêtes très difficile (Vanden Eng *et al.*, 2010). Le coût de l'intervention peut être un facteur limitant quand les frais relatifs à la méthode et son application sont chers ou non gratuits (Doannio *et al.*, 2006; Matovu *et al.*, 2009).

II-2- Evaluation entomologique de la lutte anti-vectorielle (LAV)

La morbidité et la mortalité dues au paludisme sont liées à la transmission des parasites par un vecteur infecté et donc à l'exposition des populations humaines aux piqûres des vecteurs infectés. L'évaluation entomologique de la lutte peut aider à comprendre et à expliquer les résultats des paramètres épidémiologiques (prévalence et densité parasitaires, taux d'incidence de la maladie, de morbidité et de mortalité…). Elle se fait par la détermination du niveau d'exposition aux piqûres et du taux d'infection plasmodiale des anophèles (la transmission des sporozoïtes).

II-2-1- Evaluation du risque d'exposition

Il a été montré qu'il existe une relation entre le degré d'exposition et la transmission de la maladie (Carnevale *et al.*, 1988). Même s'il n'y a pas de proportionnalité stricte entre l'abondance du vecteur et l'intensité de la transmission et entre le nombre de piqûres infectantes et la morbidité, l'échantillonnage des populations de vecteurs permet de caractériser leur abondance en fonction du lieu et de la période, et de caractériser de ce fait le risque spatio-temporel de paludisme. De plus, l'évaluation de la densité des populations adultes, donc du risque d'exposition aux piqûres, est la première démarche permettant de définir le risque de transmission (EIR = « Entomological Innoculation Rate »).

Cette étape d'échantillonnage entomologique est essentielle pour une meilleure définition des campagnes de surveillance et de contrôle effectives et sélectives des populations de vecteurs et pour évaluer l'efficacité de la LAV (Odiere *et al.*, 2007).

Aujourd'hui, les moyens entomologiques évaluant l'exposition de l'homme aux différentes espèces d'anophèles sont : les captures par pièges (pièges lumineux, moustiquaires

pièges, etc.), les captures sur « appât humains », l'imprégnation intra-domiciliaire d'insecticides pour l'étude de la faune résiduelle. La sélection des méthodes d'échantillonnage dépend de facteurs basiques comme le coût, la praticité et la reproductibilité, de l'objectif ainsi que le type d'insectes étudiés.

Captures sur appât humain :

Cette méthode consiste à capturer les femelles agressives qui essaient de se nourrir sur les humains. Elle permet de connaître les variations saisonnières et journalières, l'activité des vecteurs et de déterminer leur taux d'agressivité. Cette technique est particulièrement adaptée pour les espèces anthropophiles (Le Goff *et al.*, 1993) et représente donc la meilleure méthode d'échantillonnage pour évaluer les densités de vecteurs piquant l'Homme. On exprime alors la densité en nombre de piqûre/homme/nuit. Il existe une variabilité inter-hommes ; chaque personne est plus ou moins attractive. Cinq types de stimuli incitent une recherche de l'hôte par les moustiques, le dioxyde de carbone, l'odeur de l'hôte, stimuli visuel, la chaleur et la vapeur d'eau (McIver, 1982). Une irrégularité des captures peut également être observée dans le temps, les conditions climatiques peuvent agir sur le comportement des insectes.

Pour des raisons éthiques, ces techniques peuvent déconseillées ou non approuvées par les agences sanitaires (Rubio-Palis and Curtis, 1992; Sithiprasasna *et al.*, 2004). Cependant, les risques d'infection peuvent être évités, ou au moins réduits en faisant participer les populations locales qui ont acquis un certain statut immunitaire les rendant réfractaires à l'infection ou en leur donnant un traitement prophylactique.

Les pièges:

Les pièges utilisés sont de plusieurs types ; les types « CDD » (« CDC minature light trap », Centre for Diseases Control, Atlanta, USA) et « CFG » (« counterflow geometric trap », American Biophysics Corp., USA) étant, actuellement, les plus fréquemment utilisés dans les suivis entomologiques à large échelle (Kline, 2006; Owino, 2010). D'autant plus qu'ils peuvent être associés à des produits naturels (lait caillé traditionnel africain par exemple) ou industriels (fromages et autres produits laitiers) qui augmentent leur pouvoir attractif des moustiques culicidés (Owino, 2010). Les méthodes de piégeage renseignent sur l'abondance des différentes espèces. EBien que très utilisées, ces méthodes ne permettent pas de déterminer certains paramètres tels que l'agressivité, l'endophagie/exophagie des insectes capturés. De nombreuses études ont évalué et comparé les différentes méthodes de piégeage (Le Goff *et al.*, 1993; Mathenge *et al.*, 2005; Mathenge *et al.*, 2004). De nombreuses

variations entre les pièges ont été observées et chaque méthode semble présenter des biais. Les méthodes seront donc choisies en fonction des objectifs et du meilleur rapport coût /efficacité.

Faune résiduelle:

Cette technique consiste à recueillir le matin les insectes restés dans l'habitat par pulvérisation d'insecticide. Cette méthode renseigne préférentiellement sur les espèces endophiles. Les espèces récoltées sont identifiées morphologiquement et/ou par PCR (biologie moléculaire). Elles peuvent permettre l'étude de la transmission grâce à la détermination de leur indice spozoïtique par ELISA anti-CSP (Circum-Sporozoitic Protein).

Limites de ces méthodes de captures

Toutes les méthodes d'échantillonnage des populations de vecteurs actuelles sont sujettes à des biais. Les méthodes les plus adéquates et représentatives des populations adultes anthropophiles sont celles utilisant l'homme adulte comme appât. Mais ces techniques se heurtent à des problèmes éthiques et à la grande complexité logistique. En effet, il est recommandé de capturer sur une période suffisamment longue (piégeage continu de 4 jours) afin de réduire l'importance des fluctuations journalières. L'extrapolation aux enfants, premières victimes de la morbidité palustre, est difficile du fait de leur vulnérabilité au paludisme (Carnevale *et al.*, 1978; Smith *et al.*, 2004). L'effet de la luminosité de la lune pourrait également agir sur les collectes de nuit des anophèles (Rubio-Palis, 1992). De plus, la population humaine n'est pas homogène dans son degré d'exposition aux piqûres des insectes vecteurs. L'intensité de leur exposition peut dépendre de leur mode de vie (pêcheurs, agriculteurs, ruraux ou citadins, migrants ou sédentaires), de leur pouvoir attracteur (Takken and Knols, 1999), de leur distance aux gîtes larvaires (Smith *et al.*, 2004).

L'étude de la faune matinal résiduelle ne tient pas compte des espèces exophiles et donc ne peut pas servir d'indicateur fiable pour l'évaluation de la LAV. D'autant plus que les insecticides utilisés (pyréthrinoïdes) ont un fort effet excito-répulsif favorisant l'exophilie des anophèles.

Les captures par piégeages sont aussi confrontées à plusieurs biais et limites dans leur sensibilité, surtout en contexte de faible densité de moustiques. Le pouvoir attractif des pièges lumineux de type CDC n'est par exemple pas le même vis-à-vis des différentes espèces de vecteurs présentes dans une zone donnée. Il est très dépendant de l'écologie du vecteur.

II-2-2- Evaluation du risque de transmission

Elle dépend tout d'abord de la présence d'anophèles compétents (bonne capacité vectorielle), de leur taux d'infection par *Plasmodium*, du nombre de piqûres reçues et des caractéristiques du contact Homme-Vecteur. L'exposition au vecteur infecté est généralement évaluée par la mesure du **taux entomologique d'inoculation** (EIR= « Entomological Inoculation Rates ») qui correspond au nombre de piqûres infectantes que reçoit un Homme pendant une période donnée (Nbre piqûres infectantes/Homme/unité de temps (an, mois ou jour). Il est obtenu à partir de la formule suivante : **h = m.a.s**, dans laquelle :

m = nombre quotidien de piqûres

a = fréquence des piqûres.

m.a (nombre moyen de vecteurs piquant un homme en 24 heures) dépend essentiellement du nombre de gîtes larvaires potentiels, de la productivité en anophèles des gîtes et de l'exposition de l'homme.

s = indice sporozoïtique = SI (pourcentage d'anophèles présentant des sporozoïtes dans leurs glandes salivaires). **s** s'obtient directement par dissection des glandes salivaires pour visualiser la présence de sprorozoïtes ou par test ELISA circumsporozoïtique.

Il n'existe pas de classification des zones endémiques à partir de l'EIR mais une relation étroite entre l'intensité de la transmission anophélienne et le taux d'endémicité a été constatée (Killeen *et al.*, 2000) :

- hypo-endémicité : EIR < 10 piqûres infectantes/homme/an
- méso-endémicité : 10 ≤ EIR < 50 piqûres infectantes/homme/an
- hyper-endémicité : 50 ≤ EIR < 100 piqûres infectantes/homme/an
- holo-endémicité : EIR ≥ 100 piqûres infectantes/homme/an

La mesure du nombre de piqûres infectantes dans un site donné est la seule façon d'évaluer directement le risque de transmission du paludisme. Elle peut donc servir à mesurer l'efficacité des stratégies de LAV visant à rompre la transmission. Car elle permet de quantifier le degré d'infection d'une population de moustiques par *Plasmodium* et leur capacité à transmettre ces *Plasmodium* à l'Homme (Shaukat *et al.*, 2010). Différentes études ont montré une grande variabilité des valeurs de l'EIR à travers l'Afrique. L'EIR peut atteindre une valeur de 1000 dans les régions holo-endémiques et peut être inférieur à 1 dans des pays hypo-endémiques sahélio-soudaniens ou dans des contextes urbains. Entre ces extrêmes, on trouve des zones de paludisme saisonnier instable comme dans la majeure partie de l'Asie et de l'Amérique latine, où ces taux se situent audessous de 10, et souvent autour de 1 ou 2, et des zones de paludisme stable mais à recrudescence saisonnière, rencontrées dans la

majeure partie de l'Afrique de l'ouest où ce taux se situe entre 10 et 100. La mesure de l'EIR est cependant confrontée à plusieurs biais du fait de la non standardisation des protocoles et des méthodologies utilisés (Githeko *et al.*, 1996; Kelly-Hope and McKenzie, 2009). L'EIR est une moyenne calculée à partir d'un échantillon de « captureurs » et de moustiques capturés. Cependant, plusieurs différences de comportement de piqûres des moustiques existent. Ces différences sont dues à des facteurs tels que l'attractivité individuelle, l'âge, le type de l'habitat des individus, la proximité de gîtes larvaires… Par exemple, les femmes enceintes et les porteurs de gamétocytes augmentent la capacité d'attirer les anophèles (Lacroix *et al.*, 2005; Lindsay and Thomas, 2000). Il a été aussi démontré que les adultes attirent plus les moustiques que les enfants (Carnevale *et al.*, 1978). La mesure de l'EIR doit être envisagée en fonction de la répartition des piqûres dans l'année et entre les différentes années (Smith *et al.*, 2005). En effet, suivant les modalités de transmission, les anophèles peuvent être présents régulièrement au cours de l'année (paludisme stable) ou bien concentrés à certaines périodes, comme la saison des pluies par exemple (paludisme instable).

De plus, la mesure de l'EIR manque de précisions du fait de l'hétérogénéité remarquable de la distribution des anophèles et de la faiblesse des indices sporozoïtiques (maximum 5%) même en zone de très forte endémicité (Drakeley *et al.*, 2003; Mbogo *et al.*, 1995); sa détermination est presque impossible dans les zones de faible transmission du fait de la faiblesse des densités de moustiques capturées (Corran *et al.*, 2007). Elle est aussi confrontée à des limites pratiques et éthiques car étant basée sur les captures sur hommes adultes difficilement extrapolables aux enfants (Smith *et al.*, 2005) et des piégeages qui sont souvent limités dans leur sensibilité et la reproductibilité des résultats qu'ils donnent.

Dans un contexte urbain, où les hôtes humains prédominent, il est préférable d'utiliser une technique de capture sur appât humain, la forte disponibilité en hôtes pourrait « détourner » les anophèles des pièges lumineux.

La relation entre EIR et la morbidité n'est pas clairement établie (Smith *et al.*, 2001), le rapport entre le taux d'inoculation entomologique et la prévalence du paludisme est toutefois complexe et dépend de la nature de l'immunité contre le paludisme, de l'acquisition et de la perte de cette dernière et de la disponibilité ou non d'un traitement médicamenteux efficace.

II-2-3- L'analyse du repas sanguin

En complément à l'échantillonnage, l'analyse du repas sanguin des vecteurs permet de déterminer l'origine de l'hôte sur lequel l'insecte s'est nourri. Elle peut se faire par ELISA directe (Beier, 1998). Cette technique consiste à détecter dans le sang absorbé par les femelles

anophèles des anticorps spécifiques d'un certain nombre d'hôtes potentiels (homme, bœuf, mouton, poule, cheval, porc…).

II-3- Evaluation de l'impact épidémiologique de la lutte

L'impact épidémiologique sur la maladie, et éventuellement sur l'infection, est le premier objectif des différentes mesures de lutte, qu'elles soient dirigées contre le vecteur ou le parasite. Son évaluation concerne les aspects parasitologiques et cliniques du paludisme humain : on parle d'indicateurs parasito-cliniques.

II-3-1- Critères cliniques

II-3-1-1- Indice splénique et indice de Hackett

Dans les zones où le paludisme est la principale cause de la splénomégalie (zones de forte endémie palustre), la palpation de la rate peut être utilisée comme une méthode rapide et simple pour évaluer l'importance du paludisme dans la population. Effet, l'infection plasmodiale s'accompagne généralement d'une augmentation de la taille de la rate. On définit ainsi un indice splénique (IS) qui est la proportion d'enfants âgés de 2 à 9 ans porteurs de splénomégalie (Mouchet *et al.*, 2004).

L'indice de Hackett ou splénomégalie moyenne est la moyenne des classes de splénomégalie (classes 0 à 5 ; 0 = absence de splénomégalie) calculée en faisant la somme des produits des nombres d'enfants palpés par le numéro de leur classe de splénomégalie et en la divisant par le nombre d'enfants palpés. Ces indices ont l'avantage **(i)** d'être sensibles aux variations du niveau de transmission et à toutes les interventions antipaludiques, **(ii)** d'être estimés facilement, rapidement et à faible coût.

Cependant, un problème de reproductibilité des estimations données par ces indices se pose souvent, du fait de la difficulté de standardiser l'examen des enfants. De plus, un problème de spécificité se pose car les causes responsables des splénomégalies en zone d'endémie sont souvent nombreuses (les bilharzioses par exemple). De ce fait, l'indice splénique perd son intérêt dans les études épidémiologiques et dans l'évaluation du poids du paludisme.

II-3-1-2- La morbidité palustre

L'évaluation, par la morbidité, du poids du paludisme et de l'efficacité de la LAV est basée sur le diagnostic clinique (incidence clinique du paludisme, un critère de référence OMS). Il n'existe cependant pas de signe pathognomonique du paludisme et les signes et

symptômes sont de peu d'utilité dans le diagnostic de paludisme clinique (Genton *et al.*, 1994). Les accès de fièvre, l'anémie, les signes de gravité comme le coma ou les détresses respiratoires ne peuvent être aisément attribués à une infection plasmodiale dans les populations qui sont infectées la plupart du temps. L'attribution de ces manifestations cliniques au paludisme est problématique (manque de spécificité des signes cliniques) dans les populations exposées régulièrement à la transmission des plasmodiums humains. L'acquisition d'une immunité de prémunition et le portage asymptomatique de parasites sont très fréquents en zone d'endémie et constituent aussi un obstacle à l'évaluation de la morbidité palustre.

L'association positive entre la densité parasitaire et le risque de fièvre ne permet d'estimer qu'imparfaitement la fraction des accès cliniques attribuables au paludisme. Cela a des conséquences importantes pour mesurer le poids du paludisme dans les populations et peut être un obstacle pour évaluer et mettre au point les mesures de lutte, surtout celles à des visées prophylactiques (médicaments, vaccins, protections antivectorielles).

II-3-1-3- La mortalité palustre

Comme pour la morbidité, l'estimation de la mortalité palustre directe n'est pas aisée (Molineaux, 1997). Il est le plus souvent difficile d'attribuer correctement un décès à une cause unique (un decès est souvent lié à plusieurs causes). De plus, la plupart des cas de mortalité palustre en zone d'endémie (plus de 90% des cas) sont enregistrés en dehors des structures sanitaires (Taylor *et al.*, 2004). Parmi les signes cliniques, seules des rétinopathies détectables par l'examen du fond d'oeil permettraient, en présence d'une parasitémie patente, d'attribuer correctement les manifestations neurologiques centrales au paludisme (Beare *et al.*, 2006). Il est probable que l'attribution au paludisme des décès liés aux autres formes graves (*i.e.* autres que le neuropaludisme), sur des bases cliniques et biologiques, ait une spécificité encore moins bonne. Il n'est pas évident non plus que les données cliniques et biologiques qui sont enregistrées dans ces structures permettent un diagnostic de cause de décès fiable. Les autopsies sont effectuées exceptionnellement en zone d'endémie palustre et il n'existe pas de critère standard et reconnu pour effectuer le diagnostic de décès par paludisme. Lorsqu'elles ont été effectuées, elles ont permis de montrer que les causes réelles de décès attribuées cliniquement au paludisme pouvaient être très différentes du fait d'un manque de spécificité des signes cliniques (Beare *et al.*, 2006). En effet, parmi les 31 décès attribués au neuropaludisme dans un hôpital, 23 % avaient en réalité une tout autre cause (Taylor *et al.*, 2004).

La technique des autopsies verbales a été utilisée. Elle consiste à tenter d'identifier la ou les causes de décès selon l'âge du patient. Plusieurs études ont porté sur sa validité, sa mise au point et ses résultats et leur pertinence à évaluer la mortalité par paludisme dans différentes situations épidémiologiques (Becher *et al.*, 2008; van Eijk *et al.*, 2008). Mais toujours est-il que le risque d'erreur chez les personnes interrogées s'avère conséquent.

Lorsque il a été possible d'estimer la mortalité palustre totale (directe et indirecte) en comparant la mortalité globale avant et après l'élimination du paludisme d'une zone, des auteurs se sont rendus compte rendu compte qu'elle était environ deux fois plus importante que la seule mortalité palustre directe (Rogier *et al.*, 2009b). Pour l'estimer, il faudrait donc considérer les décès retardés. Ce mode d'évaluation pose le problème de la réelle spécificité des interventions ayant permis d'éliminer le paludisme. Par exemple, l'amélioration de la prise en charge des malades ne peut concerner que le paludisme. Et la mise en place de mesures de lutte spécifiques contre les vecteurs du paludisme peut aiguiser l'intérêt des populations pour leur santé, améliorer leurs connaissances et leurs comportements préventifs et thérapeutiques.

L'évaluation de la mortalité palustre, qu'elle soit directe ou indirecte, pose donc des problèmes difficiles à résoudre. Evaluer des interventions de lutte antipaludique par leur impact sur la mortalité générale n'est pas satisfaisante non plus à cause du manque de spécificité du critère d'évaluation.

II-3-2-Critères parasitologiques : les infections plasmodiales

Sur le plan parasitologique, l'évaluation épidémiologique de la lutte contre le paludisme se fait par l'estimation de la prévalence, de l'intensité (densité), la multicité ou de l'incidence des infections plasmodiales. De nombreuses méthodes biologiques de détection des infections plasmodiales, première étape de l'estimation de l'impact de la lutte sur le plan parasitologique, sont utilisées (voir **Chapitre I-2-3**).

La plupart de ces méthodes de diagnostic permettent, à des degrés divers (dépendant surtout de la sensibilité de la méthode utilisée), d'estimer les paramètres épidémiologiques du paludisme que sont :

- La prévalence des infections plasmodiales

Cette méthode consiste à déterminer l'indice plasmodique (I.P.) qui est la proportion (en %) d'enfants de 2-9 ans porteurs du parasite dans une population donnée et en un moment donné. La prévalence des infections plasmodiales est sensible à de nombreux facteurs. Elle

augmente avec le niveau d'exposition à la transmission des plasmodiums, le niveau de résistance des plasmodiums aux médicaments antipaludiques et pendant la grossesse (Diagne *et al.*, 2000) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité et l'utilisation d'antipaludiques efficaces. Lorsque le taux de prévalence est élevé, l'IP perd son pouvoir discriminant et ne rend plus compte des variations de niveau de transmission (Smith *et al.*, 2005), le taux de prévalence parasitaire perd donc son intérêt par rapport à la densité parasitaire moyenne ou à la multiplicité des infections. Lorsque le niveau de transmission est faible, il est alors laborieux d'estimer le taux de prévalence parasitaire (à cause des densités parasitaires basses) et de mettre en évidence les infections plasmodiales dans une petite proportion de la population humaine. L'évaluation de la prévalence plasmodiale devient alors un indicateur moins fiable dans l'évaluation de l'intensité de la transmission (Beier *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 2008). Dans ces contextes, les variations spatiales et temporelles des estimations des prévalences plasmodiales peuvent être importantes et les infections mixtes de *Plasmodium* sont souvent sous-estimées. L'utilisation de tests de diagnostic rapide (TDR) permettrait de s'affranchir des contraintes de la microscopie mais leur faible sensibilité limite leur intérêt. De plus, l'estimation de la prévalence des infections plasmodiales dépend de la sensibilité de la méthode de détection utilisée surtout en zone de faible endémie et chez les individus les plus immuns.

- La densité des infections plasmodiales

L'estimation de la densité parasitaire, c'est-à-dire la quantité de parasites dans le sang, a une importance épidémiologique et clinique. Elle constitue la méthode référence OMS pour évaluer l'efficacité de la lutte antipaludique et donc de la LAV.

Les densités parasitaires peuvent être analysées par classes, de préférence avec une progression géométrique des parasitémies. Elles peuvent aussi être analysées par leur moyenne. On utilise généralement la moyenne géométrique afin de lisser les forts écarts individuels souvent fréquents en zone de forte endémicité palustre. Ces moyennes peuvent être calculées sur les seuls individus ayant une parasitémie positive. On peut aussi estimer la moyenne géométrique des densités parasitaires en incluant les parasitémies nulles. Pour cela, on utilise la transformation log. (x + 1) à la place de la transformation log. (x) de la densité parasitaire x.

La densité parasitaire dépend de l'espèce plasmodiale (en moyenne les parasitémies les plus élevées s'observent avec *P. falciparum* et les moins élevées avec *P. malariae*) et est sensible à de nombreux facteurs. Comme pour la prévalence, elle augmente avec le niveau de

transmission, le niveau de résistance des plasmodiums et pendant la grossesse ou le post-partum (Diagne *et al.*, 2000) et diminue avec l'augmentation du niveau d'immunité, l'utilisation d'antipaludiques efficaces et l'ancienneté de l'infection. Lorsque le niveau de transmission est faible, les densités parasitaires sont basses et il devient laborieux de les mettre en évidence. Comme pour la prévalence, l'estimation des densités parasitaires dépend de la sensibilité de la méthode de détection utilisée, surtout en zone de faible endémie.

- L'incidence des infections plasmodiales

L'incidence des infections plasmodiales, le nombre de nouvelles infections pendant une période de temps donnée, peut être estimée directement. Il s'agit en pratique de dénombrer les parasitémies patentes, *i.e.* détectables, chez des patients présentant des symptômes évocateurs de paludisme et recrutés dans les structures sanitaires où ils sont consultés (détection passive des cas) ou chez eux (détection active des cas). Dans le cadre du programme d'éradication du paludisme, les nouvelles infections sont recherchées activement chez les patients et chez leurs proches. Si la population étudiée a une immunité anti-plasmodiale, même parcellaire, cette approche aboutit à une sous-estimation de l'incidence des infections. Les nourrissons nés en zone d'endémie sont souvent considérés comme non immuns. Ils peuvent cependant avoir été exposés à des antigènes plasmodiaux ou à des plasmodiums ayant traversé la barrière foeto-placentaire au cours de leur vie foetale (Dent *et al.*, 2006) ou à la naissance (infection congénitale). L'estimation du taux d'incidence des infections plasmodiales pose donc des problèmes méthodologiques liés à la sensibilité des méthodes de détection parasitaire et des conditions de validité des modèles utilisés. En pratique, elle a rarement été utilisée pour l'évaluation épidémiologique du paludisme ou de l'efficacité de méthodes de lutte dans les zones de faible transmission.

II-3-3- Analyses des données séro-épidémiologiques

La sérologie a un intérêt particulier pour évaluer rétrospectivement l'exposition au paludisme. Les réponses anticorps spécifiques aux antigènes des *Plasmodium* durent plus longtemps que les infections plasmodiales qui les provoquent. De ce fait, dans les situations de faible endémie, les marqueurs sérologiques sont plus sensibles et semblent être moins affectés par la saisonnalité de la transmission que les paramètres parasitologiques (Kelly-Hope and McKenzie, 2009; Robert *et al.*, 2006). Ils peuvent donc constituer un outil robuste pour évaluer l'efficacité des stratégies de lutte antipaludique (et donc de la LAV) et utilisable pour la surveillance du risque de transmission des *Plasmodium* même dans les régions qui

sont en phase pré-éliminatoire du paludisme (Cook *et al.*, 2010). De plus, la recherche des anticorps anti-plasmodiaux est moins laborieuse que celle des infections plasmodiales dans ces zones de faible transmission (Corran *et al.*, 2007).

Des réponses IgG contre des antigènes des stades mérozoïte et sprorozoïte ont été proposées comme des marqueurs sérologiques de la transmission, permettant ainsi de différencier des foyers avec une forte ou faible exposition au paludisme (hétérogénéité du risque de transmission), de distinguer une dynamique de transmission en fonction de la saison et d'évaluer l'efficacité de stratégies de lutte antipaludique (Baragatti *et al.*, 2009; Cook *et al.*, 2010; Corran *et al.*, 2007; Ramasamy *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 1992).

Ces méthodes sont, comme les indicateurs parasitaires, applicables aux études longitudinales ou transversales. Mais elles sont difficilement applicables chez les enfants exposés du fait d'un faible niveau de réponses Ac (très faible titre Ac) (Ramasamy *et al.*, 1994). De plus, il existe des différences importantes liées **1)** à la durée de la persistance des réponses anticorps patentes après une infection plasmodiale et **2)** à la transmission transplacentaire des immunoglobulines G (IgG) de la mère à l'enfant et de la persistance de ces IgG maternelles chez l'enfant plusieurs mois après la naissance. De ce fait, les études séro-épidémiologiques reposant sur la détection des IgG et visant à apprécier le niveau d'exposition au paludisme ne devraient pas être menées chez les nourrissons (âge < 1 an).

II-4- Approche environnementale intégrée

Les arthropodes vecteurs sont très sensibles aux conditions environnementales (climat, paysage, relief…) qui régulent la dynamique des populations de vecteurs et des maladies qu'elles transmettent. L'environnement peut être caractérisé, de manière directe ou indirecte, par des images de télédétection. L'utilisation de la télédétection dans le domaine de la santé peut permettre d'identifier des zones et des périodes à risque de manière à évaluer l'efficacité des stratégies de lutte. Cette discipline consiste à mettre en relation des paramètres environnementaux dérivés d'images de télédétection avec des données concernant soit la maladie (prévalence parasitaire) (Guerra *et al.*, 2008; Hay *et al.*, 2009) soit l'insecte vecteur (distribution des vecteurs par des données entomologiques) (Kalluri *et al.*, 2007). Ces données doivent être géo-référencées pour pouvoir être comparées aux paramètres obtenus à partir d'images satellitaires, tels que l'occupation des sols, la température, les indices de pluviométrie, la végétation (Beck *et al.*, 2000).

Les systèmes d'information géographique (SIG) sont de plus en plus utilisés pour la cartographie des maladies, l'étude des risques d'exposition et la surveillance en santé publique. Un SIG est un outil informatique permettant le recueil, le stockage, l'intégration, l'analyse et la restitution des données géo-référencées. Il permet de manipuler et de gérer des objets géographiques provenant de sources et de natures différentes. Il facilite l'analyse des relations environnement et santé.

Des approches différentes peuvent être distinguées en fonction du degré de connaissance que l'on a sur la maladie. Lorsque l'épidémiologie de la maladie est bien connue, la télédétection est utilisée comme un outil de cartographie du risque épidémiologique (Beck *et al.*, 1994). Par contre si les connaissances sur la maladie sont incomplètes, la télédétection constitue une source d'information supplémentaire pour améliorer la compréhension de l'épidémiologie de la maladie et des associations entre la distribution de la maladie et l'environnement. Des méthodes statistiques sont alors utilisées pour tester les relations entre les paramètres dérivés des données de télédétection et les données sur la distribution de la maladie. Enfin, des études se sont intéressées à prédire la distribution et l'abondance des populations des *Anopheles* (Lindsay *et al.*, 1998) en Afrique.

Chez l'homme, les moyens actuels évaluant le poids du paludisme et l'impact réel des méthodes de lutte (indicateurs épidémiologiques) sont nombreux mais présentent plusieurs limites (décrites précédemment) surtout en zones de faible transmission. Les indicateurs intermédiaires entomologiques de mesure de la transmission connaissent beaucoup de biais (favorisant une population d'insectes suivant leur écologie) et limites dans leur sensibilité et leur application aux études de terrain (coûts importants, moyens lourds pour leur mise en place). De plus, ces indicateurs entomologiques donnent une mesure de l'exposition moyenne des populations au risque de paludisme et ne permettent pas d'estimer l'hétérogénéité d'exposition entre individus, donc pas l'évaluation des méthodes de lutte individuelles. Ces différentes limites sont encore plus importantes dans un contexte de faible exposition aux vecteurs (sensibilité). La sérologie contre les plasmodiums permet d'estimer le contact Homme-Parasite mais pas directement le contact Homme-Vecteur. Elle est aussi soumise aux biais introduits par les mesures de lutte antiplasmodiale (lutte par traitement antipaludique par exemple), la multiplication des parasites chez l'Homme et l'effet cumulatif de la réponse immunitaire spécifique au parasite.

Il serait donc nécessaire de développer de nouveaux outils complémentaires permettant d'évaluer le risque d'exposition et de transmission des populations humaines aux piqûres des

insectes vecteurs. . Depuis quelques années, l'évaluation de la réponse Ac spécifique à la salive des vecteurs semble être un indicateur immuno-épidémiologique encourageant pour évaluer l'exposition aux piqûres de ces vecteurs. Ce sujet sera développé dans le **chapitre IV** (« **Etude de la relation immunologique Homme-Vecteur et applications potentielles** »).

DEUXIEME PARTIE

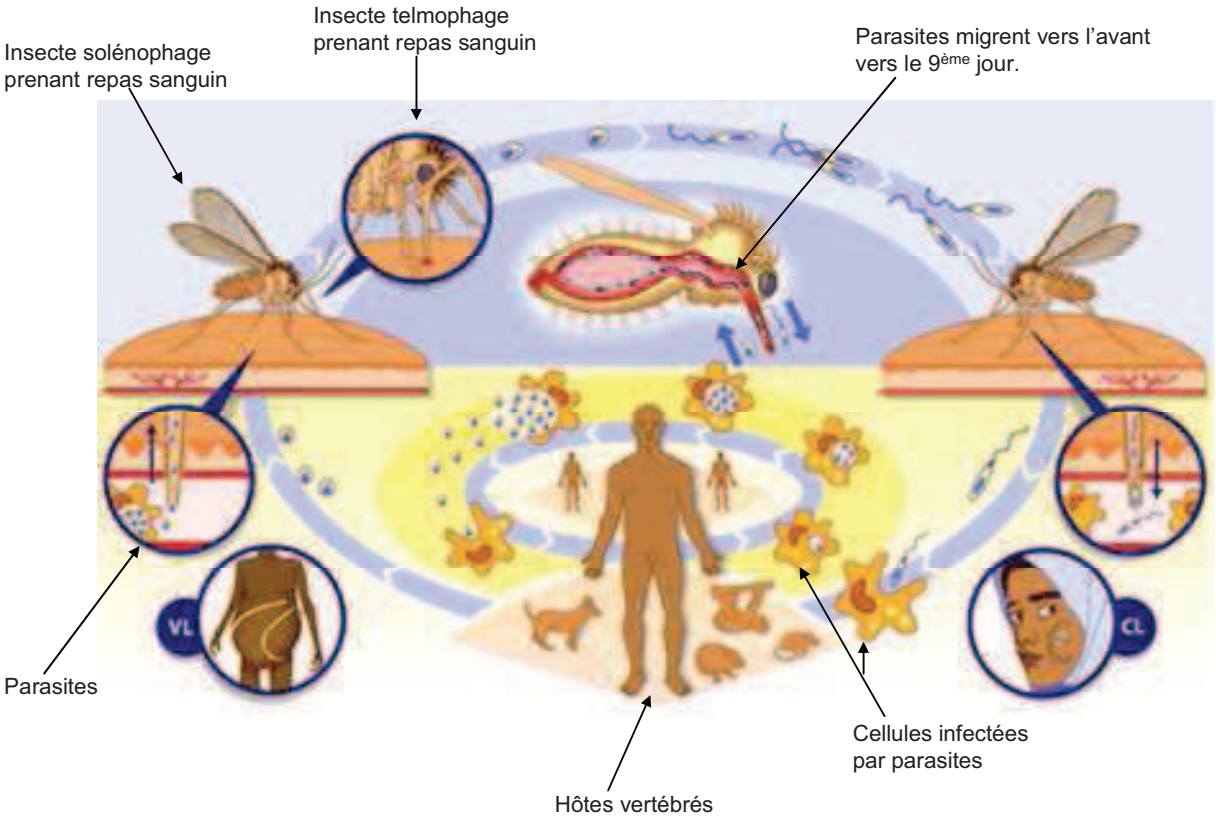
SALIVE DES ARTHROPODES VECTEURS : DIVERSITE, ROLES ET POSSIBLES APPLICATIONS

CHAPITRE III

SALIVE DES ARTHROPODES VECTEURS : DIVERSITE, ROLES PHARMACOLOGIQUE ET IMMUNOLOGIQUE

Les Arthropodes constituent l'embranchement ayant le plus grand nombre de membres (aussi bien par la diversité spécifique qu'individuelle) du phylum des Métazoaires. La seule classe des insectes comporte plus d'un million (80 à 85% des espèces animales) d'espèces décrites. Plus de 14 000 espèces d'arthropodes hématophages effectuent, plus ou moins régulièrement, des repas de sang sur des vertébrés, y compris l'homme (Rodhain and Perez, 1985). L'hématophagie découle d'un long et très complexe processus d'adaptation ayant engendré d'importantes modifications anatomiques, physiologiques et immunologiques. Ces modifications ont surtout concerné : **(i)** les pièces buccales pour faciliter leur accès aux vaisseaux sanguins, **(ii)** les glandes salivaires et l'intestin pour la neutralisation des systèmes de défense de l'hôte vertébré et la digestion et l'absorption des éléments du sang.

Seuls 2 à 3 % des arthropodes hématophages seraient des vecteurs de maladies de l'Homme ou des animaux domestiques (Rodhain and Perez, 1985). Mais, ces affections figurent souvent parmi les plus redoutables auxquelles l'homme se trouve exposé. Elles sont dues à des virus, des rickettsies, des bactéries, des protozoaires ou des helminthes que les arthropodes acquièrent au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté (**Figure 18**).



Source : http://apps.who.int/tdr/

Figure 18 : Cycle du parasite

Ces pathogènes se retrouvent alors au niveau du tube digestif de l'arthropode hématophage et vont infecter certaines cellules (cellules stomacales par exemple) ; puis ils se dispersent, généralement via l'hémolymphe, et migrent dans différents tissus suivant un tropisme propre à chacun. Certains vecteurs transmettent les parasites via le fluide coxal, les fèces ou par régurgitation mais le moyen de transmission le plus commun se fait à travers la sécrétion des glandes salivaires (donc dans la salive) au cours d'une piqûre (cycle du parasite, voir **Figure 18**). La transmission de maladies infectieuses est donc très souvent liée à la prise de repas sanguin d'un arthropode sur un hôte vertébré. Le sang peut faire partie du régime alimentaire à tous les stades de développement de l'arthropode ou seulement au stade adulte, plus rarement aux stades larvaire et nymphal. Chez les insectes, la transmission des maladies est en majorité assurée par les femelles qui ont besoin de trouver les protéines nécessaires à la maturation de leur œufs dans le sang des vertébrés, et qui jouent de ce fait un rôle crucial dans la transmission et l'épidémiologie de ces maladies (Otranto *et al.*, 2007). Chez les moustiques adultes, les 2 sexes se nourrissent habituellement de solutions sucrées (nectars) qui apportent l'énergie nécessaire aux fonctions somatiques (vol, reproduction...) (Foster, 1995), mais seules les femelles prélèvent périodiquement du sang pour la maturation de leurs œufs (Clements and Ferry, 1992). Le maximum de la synthèse de protéines indispensables à la maturation de leur oeufs est observé 48h après le repas de sang (Yoshida and Watanabe, 2006). Chez certaines espèces, comme les tiques et les glossines, les deux sexes (mâle et femelle) sont hématophages. Les tiques mâles ingèrent un repas sanguin de courte période et par intermittence, tandis que les femelles se gorgent continuellement sur une longue période.

La nature et durée de la piqûre (et donc du repas sanguin) sont variables selon les espèces. La piqûre peut être très douloureuse chez certaines espèces contrairement à d'autres. Elle ne dure que quelques minutes chez les moustiques à plusieurs semaines chez les tiques. Ceci est du à la nature de leurs pièces buccales et des composantes de leurs secrétions salivaires au moment de la piqûre (Ribeiro, 1995). En effet, en fonction de la nature des pièces buccales, on distingue 2 techniques de prélèvement du sang : les insectes solénophages (moustiques, punaises… : **figure 18**) puisent le sang directement dans un capillaire grâce à des appendices longs sous forme de stylets qui permettent de perforer les tissus de l'hôte alors que les insectes telmophages (tiques, phlébotomes, glossines…, voir **figure 18**) cisaillent, grâce à leurs pièces buccales courte et lacérant, les tissus et les parois vasculaires de la peau de l'hôte afin de créer des micro-hémorragies et se nourrir du sang (mais aussi de la lymphe et des débris cellulaires) qui en découle. La différence de nature des composants salivaires injectés au moment de la piqûre serait due à une co-adaptation différente acquise au cours de

l'évolution entre chaque arthropode et son/ses hôtes respectifs (Francischetti *et al.*, 2009; Ribeiro, 1995).

Le dimorphisme (différence morphologique entre le mâle et la femelle) noté chez les arthropodes hématophages a des conséquences sur la morphologie et les sécrétions des glandes salivaires des arthropodes (**Figure 19**).

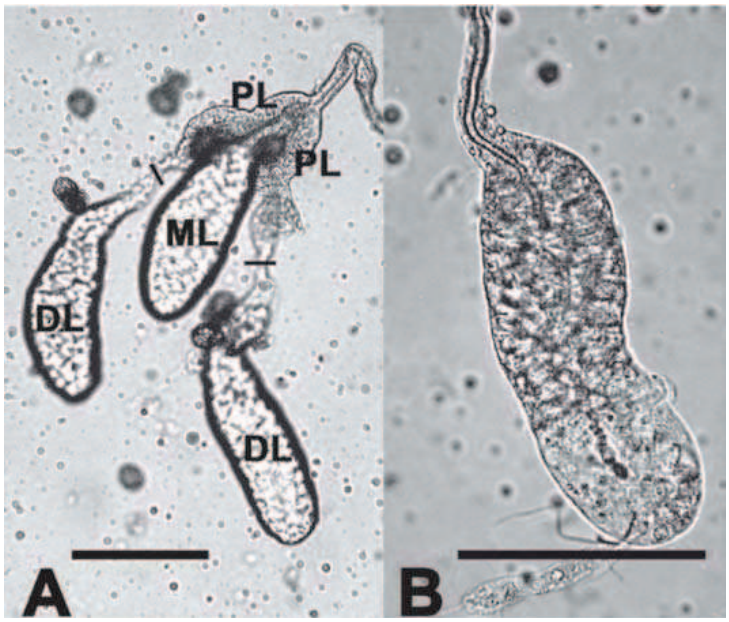


Figure 19 : Représentation schématique des glandes salivaires d'un anophèle adulte. D'après (Jariyapan *et al.*, 2007).
A= glande femelle, B= glande male, PL= région proximale des lobes latérales, DL = région distale des lobes latérales et ML= lobe médian

Les glandes salivaires des mâles sont plus petites et sécrèteraient, pour certaines espèces, moins de protéines (Li *et al.*, 2001). Les glandes salivaires des femelles montrent une histologie complexe avec de nombreux types cellulaires; celles des mâles sont constituées d'un seul type cellulaire (James, 1994). Les glandes salivaires des moustiques sont des organes pairs localisés au niveau du thorax. Chez les femelles, chaque glande est constituée de 3 lobes : deux lobes latéraux plus structurés et un lobe médian plus court (Janzen and Wright, 1971; Jariyapan *et al.*, 2007). Les lobes latéraux comportent 2 régions : une partie distale et une partie proximale séparées par une étroite zone de transition. Les cellules de la région distale sont identiques à celles du lobe médian et sont associées à la sécrétion de protéines salivaires nécessaires au repas sanguin (James *et al.*, 1991). La région proximale des lobes latérales est étroite et constituée par des structures identiques à celles des glandes salivaires des mâles; ses secrétions participent à la prise de jus sucrés et à leur digestion (Lehane and Msangi, 1991).

Dans tous les cas, la sécrétion de protéines salivaires est indispensable à la prise et la digestion du repas (sanguin ou sucré) de l'insecte hématophage (Ribeiro *et al.*, 1984a). En effet, l'hôte vertébré met en place des mécanismes de défense (réactions hémostatique et inflammatoire, réponse immune innée et adaptative) contre la perte de sang (faisant suite aux lésions des cellules de sa peau sous l'effet des piqûres) et donc contre la réussite du repas sanguin du vecteur hématophage. Ces contraintes ont amené les arthropodes, au cours de leur évolution, à mettre en place des stratégies efficaces contre les réponses de leur hôte préférentiel, expliquant ainsi la diversité structurale et fonctionnelle des constituants (molécules) de leur salive (Champagne, 2004; Ribeiro, 1995; Stark and James, 1998). Les stratégies, incluant au moins un anti-plaquettaire, une substance anticoagulante et un composé vasodilatateur, ont évolué indépendamment, mais de manière convergente après la séparation des familles des sous-familles (Ribeiro and Francischetti, 2003). Néanmoins certaines protéines salivaires sont communes à beaucoup d'espèces voire genres ou familles.

Certaines des protéines salivaires, par leurs propriétés immunomodulatrices, sont capables de moduler la réponse immune de l'hôte et de créer un microenvironnement permissif (ou non) à la transmission des pathogènes (Kamhawi, 2000; Kamhawi *et al.*, 2000; Nuttall *et al.*, 2000; Ribeiro, 1989). Les caractéristiques immunologiques de la relation hôte-vecteur sont bien décrites pour certaines maladies (leishmanioses, la borréliose de Lyme…). Certaines protéines salivaires des arthropodes sont immunogéniques et peuvent de ce fait induire une réponse immune spécifique (cellulaire et/ou humorale) chez l'hôte vertébré. L'étude de cette réponse immune spécifique à ces protéines a montré un intérêt dans l'évaluation du degré d'exposition individuelle de l'homme à la piqûre de ces arthropodes et donc au risque de transmission et de morbidité (Billingsley *et al.*, 2005; Remoue *et al.*, 2005; Waitayakul *et al.*, 2006).

III-1- De la piqûre de l'arthropode à la réponse de l'homme

III-1-1- Les pièces buccales

Les pièces buccales constituent l'ensemble des appendices qui servent à la préhension de la nourriture et à son ingestion. Leur forme et leur agencement diffèrent d'un groupe d'arthropodes à l'autre et sont caractéristiques du régime alimentaire et, dans une certaine mesure, du mode de vie de l'arthropode. Les pièces buccales peuvent être de type broyeur, piqueur, suceur, lécheur… selon que l'espèce d'insecte est omnivore, végétarienne, carnivore

ou qu'elle se nourrit de liquides. Elles se composent primitivement d'un labre impair, d'une paire de mandibules et de maxilles, d'un labium et d'un hypopharynx.

Les *Culicidae* sont des insectes piqueur-suceurs; ils possèdent des pièces buccales appelées stylets qui leur permettent de percer la peau des animaux ou les tissus de végétaux afin d'aspirer les liquides internes (sang, sève…). Les stylets, au nombre de six (deux mandibules, deux maxilles, l'hypopharynx et le labre), sont habituellement très minces et en forme d'aiguilles (**Figure 20**). Les femelles hématophages sont les seules parmi les diptères à posséder des mandibules. Ces dernières sont longues et profondément enfoncées, au moment de la piqûre, à la manière d'une seringue, jusqu'à ce qu'elles rencontrent un capillaire.

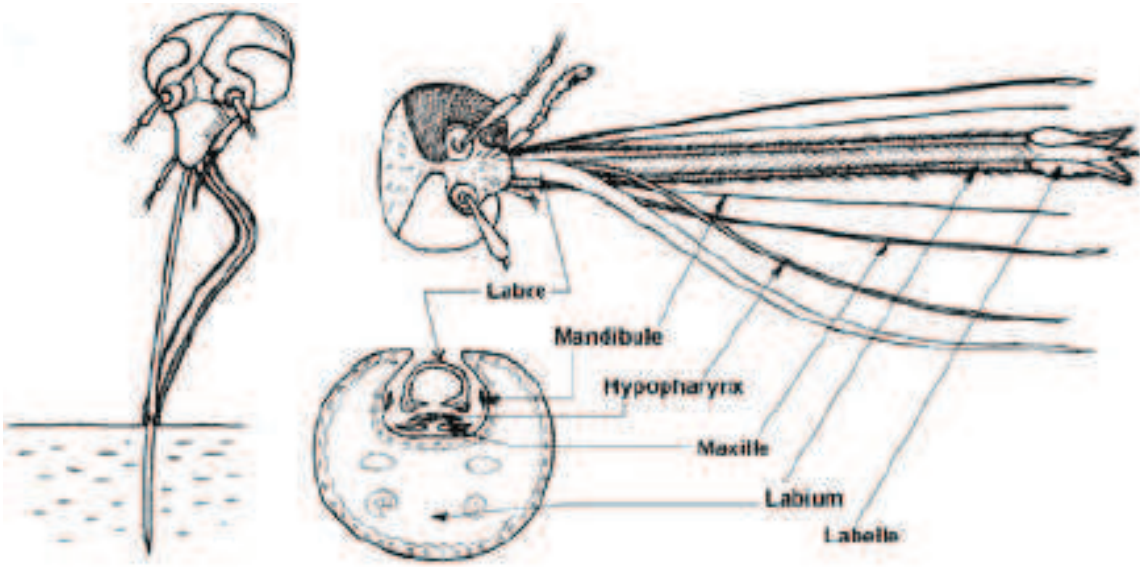


Figure 20 : Pièces buccales d'une femelle d'anophèle

La trompe, ou proboscis, est formée d'une pièce buccale souple particulière, le labium qui se termine par 2 labelles. Il forme une gouttière souple entourant et protégeant les autres pièces buccales vulnérantes (stylets) de la femelle hématophage. Certaines de ces pièces buccales forment deux canaux indépendants dans lesquels la circulation des fluides se fait dans des sens définis et inverses. Le plus gros est le canal alimentaire qui est délimité par le labre replié en gouttière. Le moustique y aspire le sang de l'hôte. Le plus fin est le canal salivaire, placé à l'intérieur de l'hypopharynx : la salive est injectée dans ce canal et circule depuis les glandes salivaires du moustique jusqu'à la partie distale de l'hypopharynx. Cela permet dans le même temps, lors de la piqûre, d'ingérer un volumineux repas sanguin et d'injecter, avec sa salive, le stade infectant du pathogène. Deux palpes maxillaires, qui jouent essentiellement un rôle sensoriel (tactile et gustatif), sont situés de part et d'autre de la trompe.

Lors de la piqûre, le labium qui joue le rôle de gaine protectrice ne pénètre pas dans les téguments de la peau mais se replie à leur surface.

III-1-2- La piqûre

La première étape lors d'une piqûre d'un insecte consiste en la localisation d'un vaisseau sanguin : c'est la phase de « probing ». Elle consiste, pour les insectes solénophages (moustiques et punaises), en un tâtonnement du derme par les pièces buccales de l'insecte qui finissent par la perforer et commencer à rechercher activement un capillaire, une artériole ou une veinule sanguine (Ribeiro, 1987b). La lacération des vaisseaux sanguins par les pièces buccales de l'insecte va entraîner des hémorragies, donc une augmentation du volume de sang au niveau du site de piqûre. Le probing dure plus ou moins longtemps en fonction des espèces d'arthropodes et du degré de vascularisation du tissu de l'hôte perforé (Ribeiro *et al.*, 1984a). Les insectes hématophages facilitent cette phase en injectant des microquantités de salive à plusieurs reprises au niveau de l'espace extravasculaire du tissu de la peau de leur hôte (Ribeiro *et al.*, 1987). Les moustiques injecteraient 50 à 60% des constituants actifs de leurs glandes salivaires pendant le repas sanguin et ils en réingéreraient environ 20%, en laissant donc 30 à 40%, ce qui équivaut à environ 0.4 paires de glandes salivaires injectées dans la peau (Wasserman *et al.*, 2004). Ces sécrétions salivaires réduisent le temps de localisation du vaisseau sanguin (Ribeiro *et al.*, 1984a). En effet, la salive injectée formerait un hématome autour des capillaires, artérioles ou veinules des tissus du derme de l'hôte; ceci, en plus de l'augmentation du volume sanguin dans les tissus, faciliterait la localisation des vaisseaux sanguins (Ribeiro *et al.*, 1984a). De plus, des moustiques, dont on a sectionné le canal salivaire, présentaient des difficultés pour perforer la peau de leurs hôtes avec leurs stylets (Mellink and Van Den Bovenkamp, 1981).

Le vaisseau localisé, l'insecte se nourrit de sang. La pénétration des stylets au moment de la prise de sang engendre des dommages cellulaires et tissulaires et une réponse contre cette agression de la part de l'hôte vertébré de type hémostatique, inflammatoire et immunitaire (Bach, 1982; Wikel, 1982). Ces réponses permettent à l'hôte de minimiser les pertes de sang en quelques secondes. De plus, le sang n'est pas très abondant au niveau de la peau des vertébrés, il représente moins de 5% de leur volume sanguin total (Ribeiro, 1987b). Des adaptations sophistiquées des pièces buccales et de la salive des insectes ont donc été nécessaires afin d'accélérer la recherche des vaisseaux et le temps de prise du repas, diminuant ainsi le temps de contact entre les 2 protagonistes : la salive des arthropodes hématophages contient des substances anti-agrégation plaquettaire, anti-coagulation sanguine,

anti-inflammatoire et vasodilatatrices leurs permettant de faire face à ces mécanismes de défenses immunitaires de leurs hôtes vertébrés. Par exemple, les substances vasodilatatrices dilatent les vaisseaux au voisinage du site de piqûre, annihilent l'effet des vasoconstricteurs libérés par l'activation des plaquettes lors de la réponse hémostatique de l'hôte faisant suite à l'effraction des tissus vasculaires et augmentent le flux sanguin vers le site de piqûre.

L'infection par un agent pathogène semble également modifier le comportement du vecteur vis-à-vis de l'homme. En effet, le temps du repas, celui de la salivation et le nombre de piqûres sont augmentés chez un vecteur infecté, ce qui faciliterait la transmission du pathogène (Ribeiro, 1995).

III-1-3- Réponses de l'homme à la piqûre

La piqûre des insectes hématophages induit chez l'hôte vertébré des réponses de type hémostatique, inflammatoire et immunitaire.

III-1-3-1- La réponse hémostatique de l'hôte

La réponse hémostatique regroupe l'ensemble des processus ou mécanismes biologiques concourrant à la cessation de l'hémorragie (suite à une rupture des parois vasculaires) et au maintien de la fluidité du sang dans les vaisseaux. Elle fait suite aux lésions des tissus vasculaires et est la première ligne de défense de l'hôte à se mettre en place pendant la piqûre par un vecteur hématophage. Elle est constituée par l'agrégation plaquettaire, la coagulation du sang et la vasoconstriction (Francischetti, 2009; Francischetti *et al.*, 2009).

Les plaquettes sanguines jouent un rôle important dans l'hémostase chez les mammifères. Un élément important de la première étape de la cascade hémostatique est la faculté qu'on les plaquettes d'interagir avec différentes molécules de leur matrice extracellulaire comme le collagène et la fibronectine. La lésion de l'endothélium des vaisseaux sanguins entraîne une libération d'ADP (Adénosine Di Phosphate), par les cellules endommagées, du collagène, par les cellules sous-endothéliales, et une interaction entre les récepteurs glycoprotéines (GP)-Ib des plaquettes et ceux vWF se liant au collagène (Furie and Furie, 2005; Goncalves *et al.*, 2003; Ruggeri, 2002; Watson *et al.*, 2005) (**Figure 21**). Une interaction entre les plaquettes et le collagène, par le biais du récepteur GP-VI, provoque ainsi un changement de conformation des intégrines-récepteurs (tel que les α_{2b}-β_3) (Jandrot-Perrus *et al.*, 2000). Ceci active les plaquettes et provoque la sécrétion du contenu de leurs denses granules : de l'ADP, de la sérotonine (HT) et du thromboxane (TX)-A2 (Furie and Furie, 2005; Watson *et al.*, 2005). L'ADP se lie aux plaquettes qui changent de forme, mobilisent du calcium (Ca2+) et initient

une agrégation réversible via la stimulation de phospholipase (PL) C. L'ADP se lie aussi aux récepteurs Gi-linked P_2Y_{12} et entraîne ainsi une inhibition de la production de médiateurs d'AMP cycliques et donc l'amplification de l'agrégation. Le résultat de l'activation des plaquettes, de la sécrétion de HT, d'ADP et de TXA2, et l'activation des intégrines-récepteurs α_{2b}-β_3 est une agrégation plaquettaire (Kahner *et al.*, 2006; Varga-Szabo *et al.*, 2008) (**Figure 21**) qui forme le thrombus blanc. Ce dernier est alors limité au niveau des lésions endothéliales par des prostaglandines et l'Endothélium-Derived Relaxing Factor (EDRF), rétrocontrôle qui empêche tout risque de thrombose, formation d'un caillot sanguin dans le vaisseau (artérioles, veinules, capillaires…), entravant la circulation sanguine.

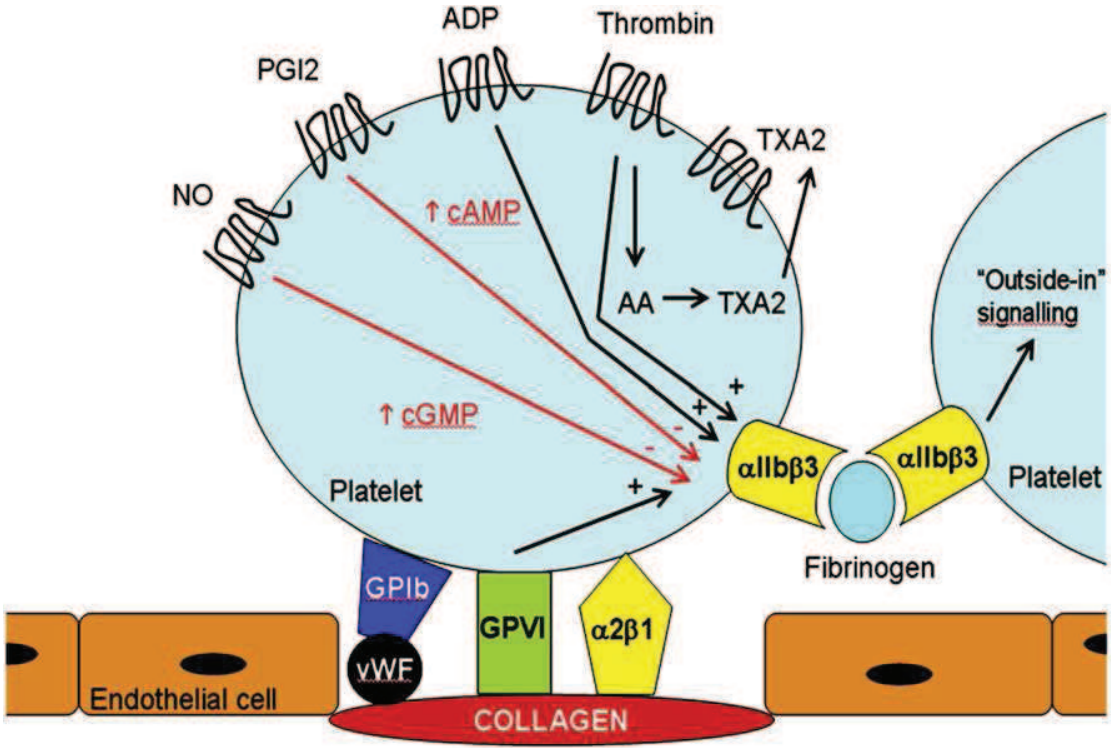


Figure 21 : Mécanismes d'activation et d'agrégation plaquettaire d'après (Francischetti, 2009)

L'ADP est donc un puissant médiateur renforçant l'agrégation plaquettaire, tandis que le TXA2 et la sérotonine, deux puissants vasoconstricteurs endogènes, provoquent une vasoconstriction qui participe à l'hémostase en diminuant le flux sanguin (Ribeiro, 1987b). Mais, le TXA2 peut jouer un rôle secondaire dans l'activation des plaquettes (Francischetti, 2009).

Parallèlement, le mécanisme de coagulation proprement dit va se mettre en place (**Figure 22**) : le fibrinogène du plasma va être transformé en un réseau de fibrine insoluble qui va

consolider le caillot plaquettaire (thrombus blanc) et donner un caillot qui retient les globules rouges, le caillot sanguin. Le mécanisme de la coagulation sanguine fait intervenir une cascade d'activation de précurseurs circulants inactifs qui doivent être clivés (perte de leur chaîne protéique) pour être activés. L'activation de cette cascade peut se faire via deux voies, une voie intrinsèque (= système de contact) et une voie extrinsèque (**Figure 22**). Les facteurs plasmatiques, désignés par des chiffres romains de I à X (suivis d'un "a" quand ils sont activés), sont essentiellement synthétisés par le foie. Les facteurs II, VII, IX et X se comportent comme des enzymes du groupe des sérines protéases et sont capables d'activer d'autres facteurs. Les facteurs V et VIII sont des cofacteurs.

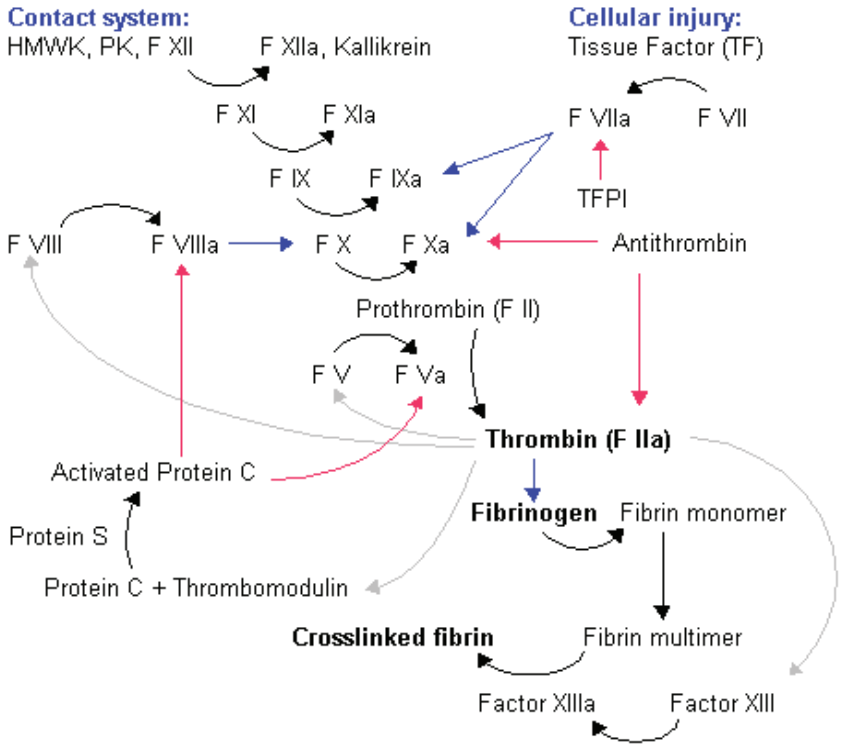


Figure 22 : Cascade de coagulation du sang chez l'Homme. D'après (Andrade *et al.*, 2005)

Le déclenchement de la voie de coagulation extrinsèque ou exogène est essentiellement dû à la libération du facteur tissulaire à partir des cellules lésées (Davie *et al.*, 1991; Giesen *et al.*, 1999). Le facteur tissulaire est une glycoprotéine qui est exprimée à la face externe des membranes des cellules endothéliales. En présence de phospholipides membranaires et de calcium, il initie la cascade en activant le facteur VII qui est véhiculé par le sang jusqu'aux tissus (Bauer *et al.*, 1990; Broze, 1995; ten Cate *et al.*, 1993). La cascade résulte en la production de thrombine (IIa). Sous l'action de cette dernière les chaînes de fibrinogène s'associent et se polymérisent en un réseau de fibrine insoluble (**Figure 22**). Le fibrinogène

(ou facteur I) est synthétisé par le foie et est retrouvée en quantité abondante dans le plasma (2 à 4 g/L). La thrombine permet également l'activation directe des plaquettes et du facteur XIII. Ce dernier va alors stabiliser le caillot de fibrine.

III-1-3-2- La réaction inflammatoire

La destruction des tissus par les pièces buccales des insectes entraîne également la mise en place d'une réaction inflammatoire de la part de l'homme. Elle se caractérise par la triple réponse de Lewis : douleur, chaleur, rougeur ; les 2 derniers résultant d'une vasodilatation locale. La présence des macrophages semble être indispensable à la mise en place de l'inflammation (**Figure 23**). En effet, il a été montré avec un modèle murin que l'injection de la salive d'*An. stephensi* n'entraînait une inflammation de la peau qu'en présence des macrophages (Demeure *et al.*, 2005).

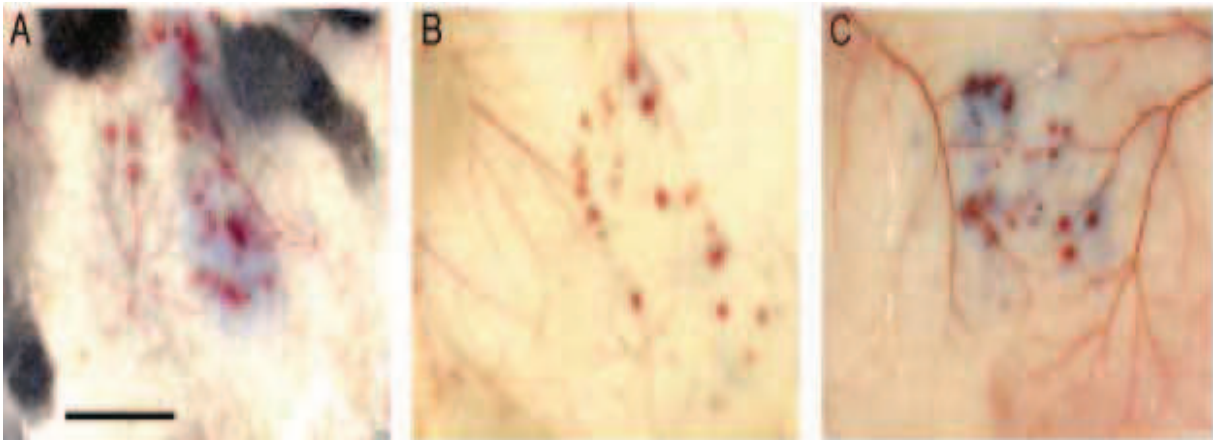


Figure 23 : Inflammation, dépendante des mastocytes, de la peau de souris induite par la piqûre d'*An. stephensi.* D'après (Demeure *et al.*, 2005)

A = souris avec mastocytes, B= souris sans mastocytes et C= souris avec mastocytes reconstitués après destruction

Le mécanisme déclencheur est l'activation du facteur XII par le complexe prékallikréine –HK (hight molecular weight kininogen) et par le collagène libéré par les cellules lésées. Ceci va activer la cascade de la voie endogène (voie intrinsèque) du système de coagulation ou système contact. Cette activation entraîne la libération de bradykinine par les mastocytes, un médiateur de l'inflammation, responsable d'une vasodilatation localisée, d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et de la sensibilité à la douleur due à la piqûre de l'arthropode (Colman and Schmaier, 1997).

De nombreuses molécules interagissent pour générer la douleur qui accompagne l'inflammation (Millan, 1999). L'ATP libéré par les cellules lésées active les polynucléaires neutrophiles qui s'accumulent et dégranulent au niveau du site de blessure (O'Flaherty and Cordes, 1994). Ils libèrent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6 et TNF-α) responsables aussi de l'augmentation de la douleur (Cook and McCleskey, 2002). La sérotonine et de l'histamine libérées par les plaquettes et les mastocytes sont également impliquées dans l'exacerbation de la douleur et l'augmentation de la perméabilité des vaisseaux.

Après cette phase aigue, les réactions inflammatoire et hémostatique produisent un environnement particulier qui permet l'angiogénèse, formation de nouveaux vaisseaux sanguins, avec migration et prolifération des fibroblastes.

III-1-3-3- La réponse immune

Tous les effets observés de la salive des arthropodes sur la physiologie de l'hôte sont dus à une ou un groupe de molécules. Certaines de ces molécules salivaires peuvent aussi être immunogéniques et vont induire chez l'hôte une réponse immune innée (non spécifique) et adaptative (spécifique). La première ligne de défense du système immunitaire lors de la piqûre est la mobilisation des éléments de l'immunité innée (y compris les médiateurs de l'inflammation). Ces éléments qui se mettent en place sans l'intervention de la mémoire immunologique sont : le complément, les mastocytes, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK (Natural Killers) et leurs différentes secrétions (cytokines notamment) (**Figure 24**). Ces molécules (molécules du complément, cytokines…) et cellules (leucocytes) responsables de la réponse innée sont très nombreux dans les tissus dermiques et épidermiques de la peau des vertébrés et sont, donc, en contact avec les pièces buccales et la salive lors de la piqûre (Francischetti *et al.*, 2009).

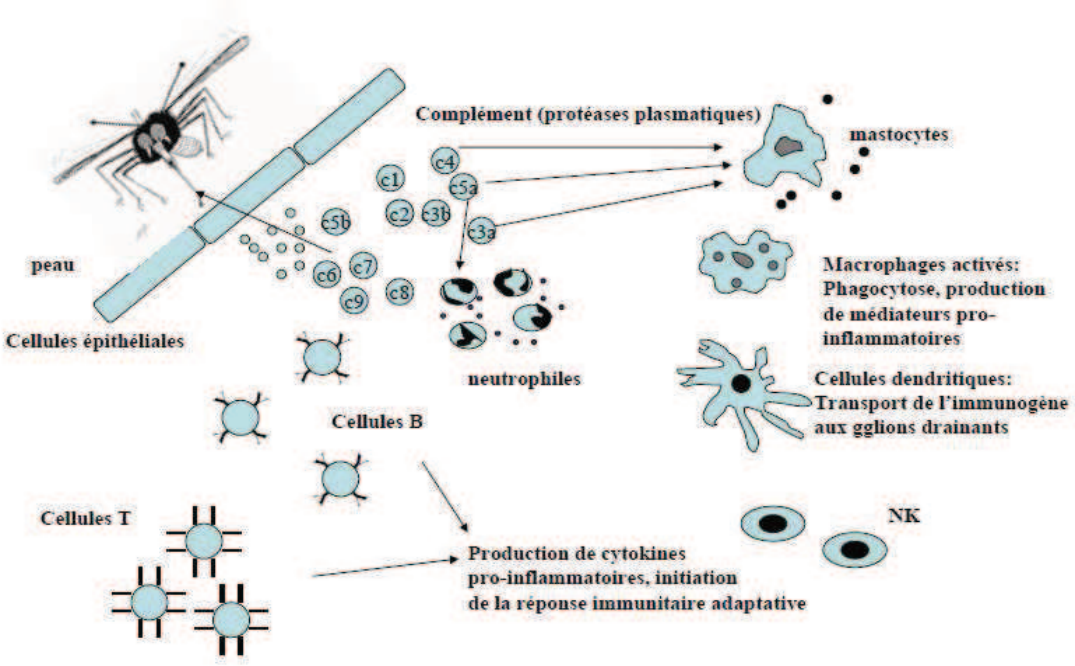


Figure 24: Réponses immunes de l'hôte contre la salive des arthropodes hématophages d'après (Andrade *et al.*, 2005)

Le complément est un ensemble de plus de 35 protéines circulantes et membranaires. Certaines sont impliquées dans l'activiation des cascades enzymatiques de l'hôte vertébré (cascade de la coagulation sanguine par exemple), d'autres dans la régulation de ces cascades afin d'empêcher les effets potentiellement néfastes sur les cellules hôtes, enfin, certaines autres sont des récepteurs cellulaires ou des fragments de certaines composantes non engymatiques du complément. Il existe actuellement 4 voies d'activation du système du complément : les voies classique, alternative, des lectines et de la propedine (Kemper *et al.*, 2010). Le système du complément est activé suite à des interactions en cascade entre diverses protéines plasmatiques via une série de réactions enzymatiques. Lors d'une infection (ou présence d'antigènes, de façon plus large), son action se fait généralement en deux temps : une phase précoce qui concernent les protéines C1 à C4 et une phase tardive englobant l'activité des protéines C5 à C9 (voir **figure 24**). Les protéines de la phase précoce sont les premières à être activées par une cascade d'enzymes amplificatrices identique à celle de la coagulation sanguine. Les fragments C3a, C4a et C5a vont activer les mastocytes qui secrètent de l'histamine, des cytokines et autres substances pro-inflammatoires (Delves et Roitt, 2000). C5a est aussi capable d'attirer, par chimiotactisme, les neutrophiles. Les composantes C5b, C6, C7, C8 et C9 du complément constituent le complexe d'attaque de la membrane cellulaire (Delves and Roitt, 2000). Ce complexe peut perforer la membrane des cellules des pièces buccales des insectes hématophages et entraîner leur mort. Le complément

constitue ainsi une voie alternative augmentant la résistance de l'hôte vertébré vis-à-vis de la perte de son sang sous l'effet de la piqûre de l'arthropode hématophage (Wikel, 1979). De plus, les fragments C3a et C5a provoquent une sécrétion de médiateurs actifs augmentant la perméabilité vasculaire, facilitant ainsi l'accumulation d'anticorps et de cellules immunitaires au niveau du site de la piqûre.

Les mastocytes sont distribués dans tout le corps des vertébrés, au niveau des connections tissulaires, surtout sous les surfaces épithéliales exposées à l'environnement externe comme la peau. Contrairement à la plupart des cellules du système immunitaire, les mastocytes ont une durée de vie relativement longue, variant de plusieurs mois à des années. Ils présentent des granules chargées d'histamine et de sérotonine et une grande affinité avec les récepteurs spécifiques des IgE (Boyce, 2004). Ils sont activés en présence de complexes formés d'antigènes divalents de la salive de l'insecte et d'IgE. Une fois activées, les mastocytes secrètent plusieurs acides métaboliques et une diversité de cytokines pro-Th2 (IL-10, IL-4…) déclencheurs de la production d'anticorps. Les mastocytes peuvent aussi être responsables de la production de la bradykinine (Boyce, 2004).

Les cellules dendritiques (= cellules de Langherans au niveau de la peau) se rencontrent, souvent sous forme immature, au niveau des tissus et organes non lymphoïdes comme la peau et les muqueuses. Leur principal rôle est de présenter les antigènes aux cellules de l'immunité adaptative, surtout aux celles T. Elles constituent de puissants stimulateurs des cellules T naïfs et jouent accessoirement le rôle de phagocytes (Banchereau and Steinman, 1998; Blanco *et al.*, 2008).

Les macrophages et les neutrophiles jouent un rôle important dans la phagocytose et la production de cytokines pro-inflammatoires. Les macrophages jouent un rôle essentiel dans la présentation des antigènes. Ils peuvent aussi intervenir dans l'initiation et l'induction de la réponse immune adaptative par les cytokines qu'ils secrètent.

Des réponses immunitaires adaptatives à médiation cellulaire et humorale sont aussi mises en place par l'hôte lors de la piqûre de l'insecte hématophage (**Figure 24**). En effet, les antigènes salivaires injectés au moment de la piqûre sont présentés aux lymphocytes immunocompétents par les cellules de Langehans localisées sous la base des épidermes (Schoeler and Wikel, 2001). Un influx constitué des lymphocytes (T et B), des macrophages, des basophiles et des éosinophiles de l'hôte est noté au niveau du site de piqûre (Belkaid *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2003; Schoeler and Wikel, 2001).

III-2- Propriétés pharmacologiques des protéines salivaires

Pour faire face aux contraintes imposées par les vertébrés, les arthropodes injectent au cours de la piqûre des molécules salivaires de nature biochimique différente (protéines, acides nucléiques, glucides….) dans la peau de l'hôte (Ribeiro and Francischetti, 2003). Par leurs propriétés pharmacologiques, ces substances affectent les systèmes hémostatique, inflammatoire et immunitaire de l'hôte vertébré modifiant ainsi sa physiologie et permettant à l'insecte de piquer et de réussir tranquillement son repas sanguin (Champagne, 2004; Champagne and Ribeiro, 1994). Divers travaux, basés sur des techniques moléculaires de séparation et d'analyse (identification du DNA, analyse protéomique, analyse génome, transcriptome ou sialome…), ont montré l'existence d'une diversité naturelle, structurale et fonctionnelle des éléments sécrétés des glandes salivaires d'arthropodes hématophages (vasodilatateurs, des inhibiteurs de l'agrégation plaquettaire, des anticoagulants ou inhibiteurs de la cascade de coagulation (Calvo *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2006; Francischetti, 2009; Valenzuela *et al.*, 2002b; Valenzuela *et al.*, 2002c).

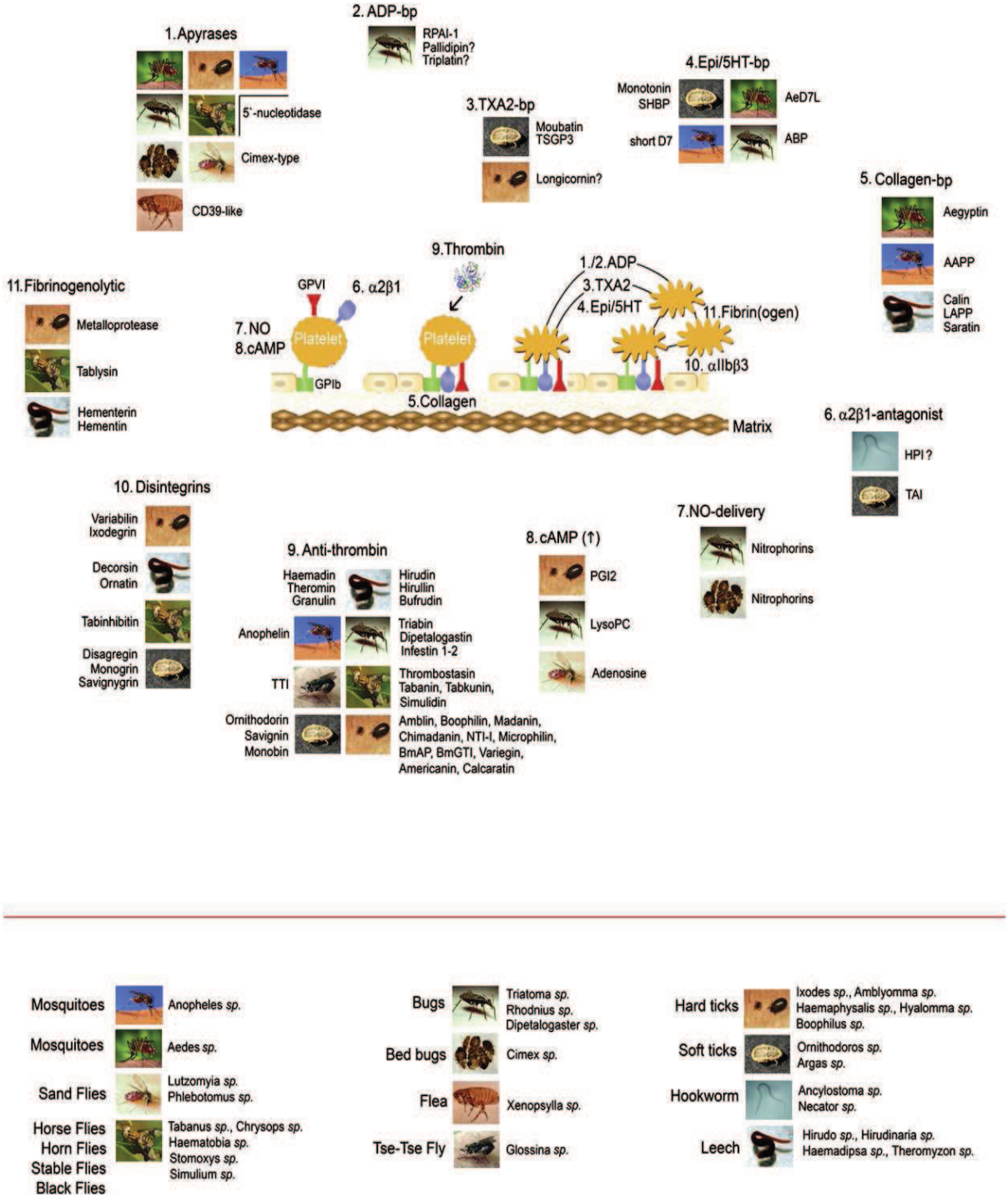


Figure 25 : Hématophagie et inhibition de la réaction hémostatique de l'hôte par la salive du vecteur: diversité des molécules salivaires anti-hémostase. D'après (Francischetti, 2009).

III-2-1- Inhibition de l'agrégation plaquettaire

La salive des insectes contient un cocktail et une diversité structurale et fonctionnelle de molécules anti-agrégantes permettant de fluidifier le sang et de faciliter ainsi une prise du repas sanguin plus rapide et complète (**Figures 25 et 26**).

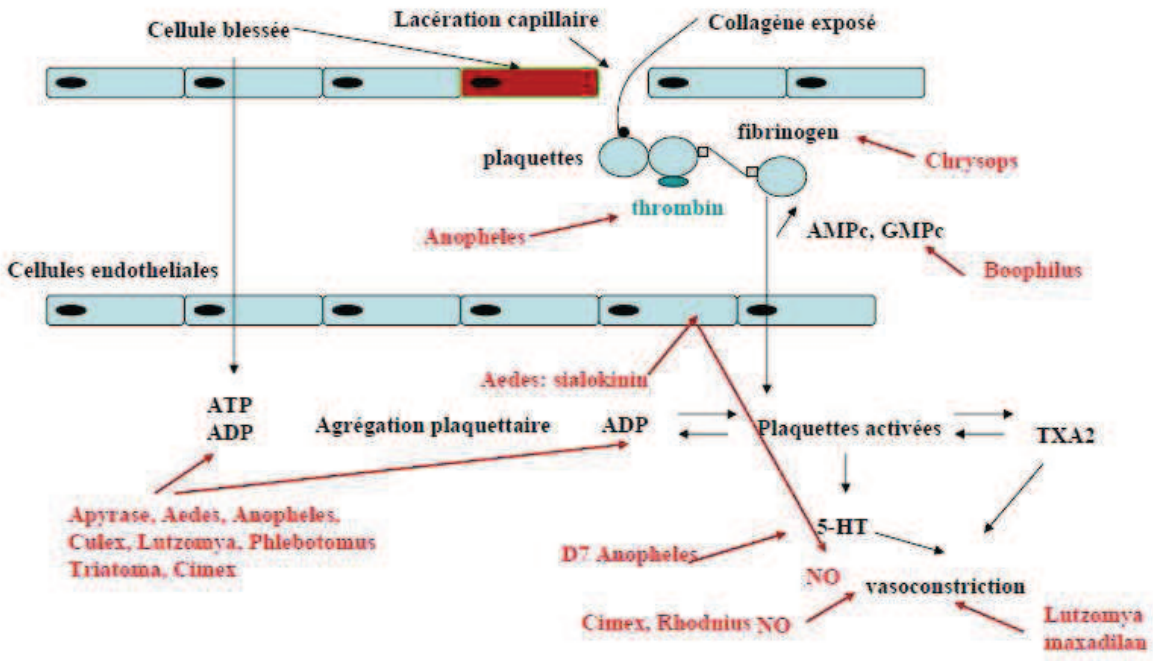


Figure 26 : Inhibition de l'agrégation plaquettaire par la salive des arthropodes hématophages. D'après (Andrade *et al.*, 2005)

Apyrase (ATP-diphosphohydrolase EC 3.6.1.5)

C'est la protéine anti-agrégation plaquettaire de la salive des arthropodes hématophages la plus importante et la plus ubiquitaire. La salive de nombreuses espèces d'arthropodes hématophages contient une quantité importante d'apyrase qui hydrolyse l'ADP et l'ATP en AMP et en phosphate inorganique, inhibant de ce fait l'agrégation plaquettaire (Ribeiro *et al.*, 1991; Ribeiro and Francischetti, 2003).

Trois classes d'apyrases ont été décrites et moléculairement caractérisées chez différents arthropodes hématophages. Une 1ère qui appartient à la famille des 5'-nucléotidases a été identifiée dans la salive d'*Aedes aegypti* (Champagne *et al.*, 1995), d'*Anopheles gambiae* (Lombardo *et al.*, 2000), de Culex (Nascimento *et al.*, 2000), de *Glossina morsitans* (Van Den Abbeele *et al.*, 2007), *Triatoma infestans* (Faudry *et al.*, 2004a; Faudry *et al.*, 2004b), de tiques molles telle que *Ornithodorus savignyi* (Stutzer *et al.*, 2009), de tiques dures telle que *Boophilus microplus* (Liyou *et al.*, 1999) et de tabanidés *Chrysops sp* (Reddy *et al.*, 2000). Une autre famille d'apyrases, enzymatiquement active, a été initialement identifiée dans les glandes salivaires de la punaise de lit *Cimex lectularius* (Valenzuela *et al.*, 1998). Les membres de cette famille de protéines ont par la suite été confirmés chez *Phlebotomus papatasi* (Valenzuela *et al.*, 2001) et *Lutzomyia longipalpis* (Charlab *et al.*, 1999). Enfin, la 3ème classe d'apyrases, identifiée dans de la puce *Xenopsylla cheopis*, a une séquence

protidique qui ressemble à celle des protéines de la famille des nucléotidases CD39 trouvées dans l'endothélium (Andersen *et al.*, 2007).

Ces apyrases diffèrent, suivant les espèces, par leur pH optimal d'action et dans la nature des cations divalents requis pour leur activation (Ca2+ ou Mg 2+) (Ribeiro, 1987b).

Chez les moustiques *Aedes*, elle est exprimée préférentiellement dans le lobe distal des glandes salivaires chez les femelles (Smartt *et al.*, 1995) alors que les mâles en présentent un taux vingt fois inférieur (Ribeiro *et al.*, 1984b). Elle semblerait absente chez les mâles *Anopheles* (Calvo *et al.*, 2006b). L'apyrase a une grande importance dans le comportement alimentaire des moustiques. En plus de ses propriétés anti-hémostase, elle intervient dans le contrôle du temps de probing d'*An. gambiae* (Boisson *et al.*, 2006). En effet, une relation inversement proportionnelle a été remarquée entre le taux d'apyrase et le temps de probing (Ribeiro *et al.*, 1985b).

Autres anti-agrégations plaquettaires

C'est le cas de l'**anopheline** de la salive d'*An. albimanus* (Francischetti *et al.*, 1999) et de la **Tsetse Thrombin Inhibitor** (TTI) des glossines qui sont des anti-thrombines (Cappello *et al.*, 1996) et qui présentent également une activité visant à inhiber l'agrégation des plaquettes sanguines.

Des **prostaglandines**, similaires à celles rencontrées chez l'homme, assurent l'inhibition de l'activité des plaquettes chez certaines espèces de tiques telles que *Ixodes scarpilarus* et *Amblyomma americanum* (Ribeiro *et al.*, 1992).

Le «***Rhodnius prolixus* aggregation inhibitor»-1 (RPAI-1**) est une lipocaline de 19-kDa identifiée dans les glandes salivaires de *Rhodnius prolixus* (Francischetti *et al.*, 2000). RPAI-1 a une forte affinité avec les acides nucléiques et se lie à l'ATP, à l'ADP et au collagène empêchant ainsi ces deux derniers de jouer leur rôle dans l'agrégation plaquettaire (Francischetti *et al.*, 2002a).

La **pallidipin**e de *Triatoma pallidipennis* (Noeske-Jungblut *et al.*, 1994), la **moubatine** d'*Ornithodorus moubata* (Keller *et al.*, 1993; Waxman and Connolly, 1993) et la **triplatine** de *Triatoma infestans* (Morita *et al.*, 2006) sont aussi des lipocalines qui inhibent l'agrégation plaquettaire en empêchant l'activation des plaquettes par le collagène (Montfort *et al.*, 2000; Morita *et al.*, 2006).

L'**aegyptine** d'*Aedes aegypti* et l'**anopheline** d'*Anopheles stephensi* sont aussi capables d'inhiber l'induction de l'agrégation plaquettaire par le collagène (Calvo *et al.*, 2010; Yoshida *et al.*, 2008).

III-2-2- Inhibition de la coagulation

Les insectes hématophages ont mis au point des stratégies afin de détourner le processus de coagulation (**Figures 25 et 27**). Certains produisent des facteurs anti-coagulants, d'autres synthétisent des molécules qui interagissent à différents niveaux dans la formation du caillot (Champagne, 2004). La thrombine est un élément indispensable à la coagulation du sang chez l'homme : en plus d'avoir la capacité de stimuler directement l'agrégation plaquettaire, elle accélère la cascade de coagulation et transforme le fibrinogène en fibrine. La plupart des insectes hématophages ont sélectionné dans leur salive au moins une substance anti-thrombine.

L'**anopheline** (peptide de 6,5 kDa) d'*An. albimanus* (Francischetti *et al.*, 1999; Valenzuela *et al.*, 1999) et des composés salivaires de tiques de genres *Boophilus* et *Ixodes* (Anastopoulos *et al.*, 1991; Hoffmann *et al.*, 1991), de triatomes (Noeske-Jungblut *et al.*, 1995) et de *Glossina morsitans* (Parker and Mant, 1979) inhibe directement l'action de la thrombine (**Figure 27**). Il en est de même que le **tsetse thrombin inhibitor** (TTI, 32 aa) qui est le composé majeur retrouvé dans les glandes salivaires de *Glossina morsitans morsitans* (Cappello *et al.*, 1996; Cappello *et al.*, 1998) et la **simulidine** des simulies (Abebe *et al.*, 1996).

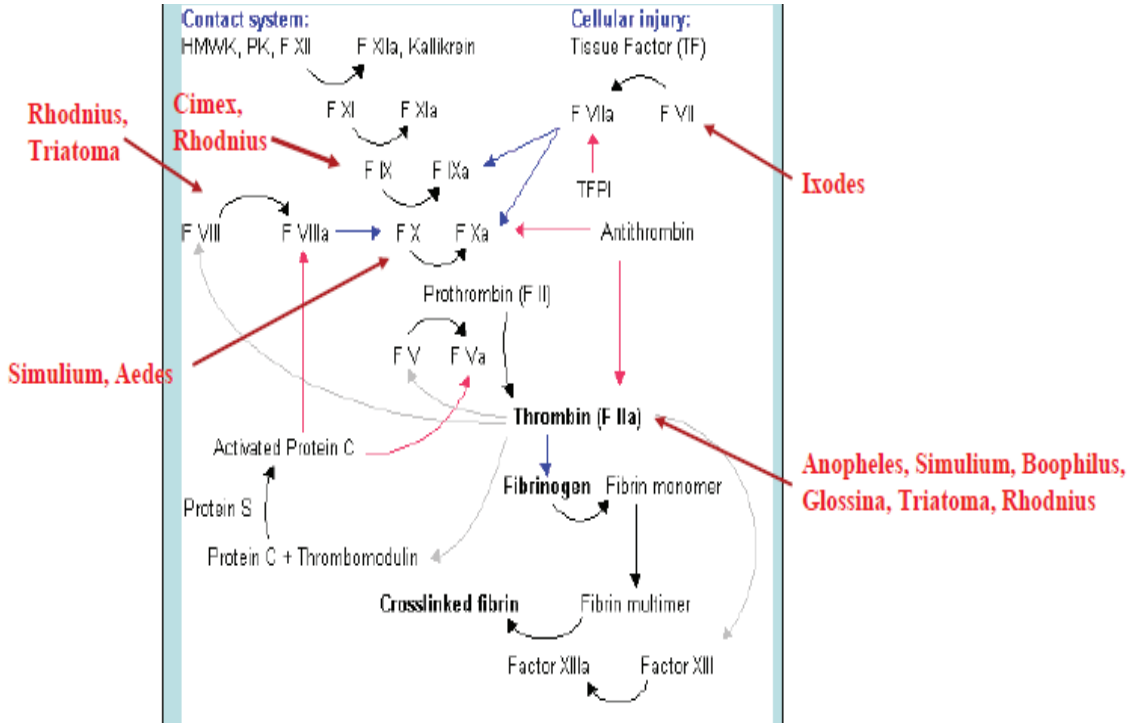


Figure 27: Effet de la salive des arthropodes vecteurs sur la cascade de coagulation. D'après (Andrade *et al.*, 2005).

L'inhibition des autres facteurs de coagulation a également été rapportée (**Figure 27**). Les *Culicidae* possèdent une molécule qui inhibe directement le facteur Xa en présence de Ca2+ (Stark and James, 1998). Une activité anti-Xa a également été reportée chez de nombreux vecteurs : les tiques (Jordan *et al.*, 1990), les *Culicoïdes* (Perez de Leon *et al.*, 1998), *Simulium vittatum* (Abebe *et al.*, 1996; Jacobs *et al.*, 1990) et chez les glossines (Cappello *et al.,* 1996). Ces molécules inhibitrices du facteur Xa appartiennent à la « Serpin domain family ». Les protéines de cette famille sont inhibitrices de protéases et exprimées par tous les insectes hématophages dans leur salive (Imamura *et al.*, 2005; Imamura *et al.*, 2006; Kanost, 1999; Stark and James, 1998). L'inhibition d'autres facteurs de coagulation (anti-Va, -VIIa, –VIIIa, -IXa et -XIIa) a été aussi reportée chez d'autres espèces (Campos *et al.*, 2004). Une protéine anticoagulante de la salive de *Rhodnius prolixus*, la prolixine-S correspondant à la nitrophorine 2, molécule vasodilatatrice, inhibe les voies de coagulation intrinsèque et extrinsèque en empêchant l'activation du facteur X en se liant au facteur VIII ou IX (Ribeiro *et al.*, 1995).

Les tiques *Ripicephalus bursa*, *Haemaphysalis longicornis*, *Dermacentor andersoni* et *R. microplus* présentent dans leur salive des protéines inhibitrices de carboxypeptidases N et B du plasma affectant ainsi la lyse du fibrinogène et donc la formation de fibrine (Arolas *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2007).

Des protéines appartenant à la famille D7, protéines fortement exprimées dans la salive des moustiques (protéines majeures), interviennent également dans l'inhibition de la coagulation (Valenzuela *et al.*, 2002a). Une protéine de 16KDa appartenant à une famille proche de celle des D-7 a été décrite chez *An. stephensi* : l'**hamadarine** qui inhibe le système de contact en empêchant l'activation réciproque entre le Facteur XII et la Kallikréine en présence de $Zn^{2}+$ (Isawa *et al.*, 2002).

III-2-3-Vasodilatation

De nombreux vasodilatateurs de diverses natures ont pu être caractérisés dans la salive de divers arthropodes piqueurs. Ces substances vasodilatatrices augmentent le flux sanguin et contrent l'effet des vasoconstricteurs endogènes (TXA2, sérotonine…) produits par le système hémostatique à la suite de la blessure due à la piqûre (Andrade *et al.*, 2005; Ribeiro, 1987). Ces vasodilatateurs agissent directement ou indirectement sur des cellules musculaires lisses activant ainsi des enzymes intracellulaires comme l'adenylate cyclase et la guanylate cyclase qui sont nécessaires à la formation de l'Adénosine Mono-phosphate cyclique (AMPc) et de la Guanosine Monophosphate cyclique (GMPc).

- Catechol Oxidase/peroxidase

Les moustiques *Anopheles* (*An. albimanus* et *An. gambiae*) sécrètent une myéloperoxydase à activité catechol oxidase/peroxidase qui permet la production de peroxyde d'hydrogène (H2O2) utilisé pour oxyder et détruire la sérotonine et la noradrénaline, des vasoconstricteurs produits par l'hôte (Ribeiro and Nussenzveig, 1993).

-Peptides à action vasodilatatrice

Certains arthropodes utilisent des peptides ou des petites protéines qui interagissent avec les récepteurs endogènes des vertébrés.

Le maxidilan (MAX), décrit pour la 1ère fois dans la salive de *Lutzomyia longipalpalis* (Lerner *et al.*, 1991), est le plus puissant vasodilatateur salivaire connu et présente également des propriétés immunomodulatrices impliquées dans l'exacerbation de la pathologie de la leishmaniose (Lerner and Shoemaker, 1992). Il agit comme un antagoniste d'un polypeptide se liant et activant l'adenylate cyclique et entraîne ainsi une augmentation du taux de l' AMPc au niveau des cellules musculaires lisses (Grevelink *et al.*, 1995). Les phlébotomes de l'ancien monde (*Phlebotomus papatasi*) eux ne possèdent pas la protéine MAX mais ils accumulent dans leur salive des amines (adénosine et AMP) vasodilatatrices (Ribeiro *et al.*, 1999). *Similium vittatum* possède un peptide de 15 kDa comparable au MAX (Cupp *et al.*, 1998).

Chez *Aedes*, on a 2 **tackikinines** appelées **Sialokinine 1 et 2**. Ces 2 petits peptides miment l'action d'une substance P (autre petit peptide endogène) qui agit directement sur l'endothélium pour activer la production l'oxyde nitrique par les cellules endothéliales (Champagne and Ribeiro, 1994; Ribeiro *et al.*, 1994) engendrant ainsi une dilatation des vaisseaux sanguins. Ces peptides sont spécifiques aux moustiques de la famille des *Culicidae* (Ribeiro *et al.*, 1994) et permettent l'activation des macrophages et la présentation des antigènes (activités immuno-modulatrices).

- Oxyde nitrique (NO)

L'activité vasodilatatrice de la salive de *Rhodnius prolixus* a montré des ressemblances avec les nitro-vasodilatateurs qui libèrent du NO dans le sang (Ribeiro *et al.,* 1990). Quatre protéines transporteuses de NO ont été mises en évidence dans la salive de *Rhodnius* prolixus : les nitrophorines (NP 1-4, environ 20kDa) (Champagne *et al.*, 1995a; Ribeiro and Walker, 1994). Elles sont stockées dans le lumen des glandes salivaires ; le NO est synthétisé par une NO synthétase intracellulaire. Ces protéines à hème permettent de lier, de stabiliser et

de relarguer le NO dans des conditions particulières (Ribeiro *et al.*, 1993). Les nitrophorines peuvent être classifiées en 2 catégories : NP1 et NP4 (90% d'identité) dissocient le NO au niveau du site de piqûre tandis que NP2 et NP3 (79% d'identité) diffusent le NO plus longtemps et donc plus largement (Andersen *et al.*, 2000). Les nitrophorines ont également une activité anti-histaminique (Ribeiro and Walker, 1994). L'histamine se lie à l'hème sur le même site de liaison que le NO (Weichsel *et al.*, 1998). Ce mécanisme inhibe la détection, par l'homme, de l'augmentation d'histamine relarguée par les mastocytes au niveau du site de piqûre pour signaler la détérioration des tissus, au moins le temps que l'insecte ingère son repas. NP2 présente également des propriétés d'inhibition du facteur Xa (Zhang *et al.*, 1998). Un système de stockage et de relargage de NO a aussi été retrouvé chez le vecteur *Cimex lectularius* (Valenzuela *et al.*, 1998; Valenzuela and Ribeiro, 1998).

- Prostaglandines

Les tiques produisent une grande quantité de prostaglandines dont PG-E2 et PG-F2. Ces substances ne sont pas stockées dans les glandes salivaires, mais sont produites constitutivement au cours du repas (Bowman *et al.*, 1996; Dickinson *et al.*, 1976; Ribeiro *et al.*, 1992).

L'hémostase est un mécanisme complexe et différent entre les différentes espèces de vertébrés. Les arthropodes ont mis en place différentes stratégies efficaces contre le système de leur hôte préférentiel, expliquant ainsi la diversité des protéines salivaires entre les différents insectes hématophages. Les moustiques *Culicinae* (*Aedes* et *Culex*) expriment dans leur salive surtout des tackinines (**Sialokinines 1 et 2**) qui ont un puissant rôle vasodilatateur alors que la salive des *Anophelinae* (*Anopheles*) présente sur de l'**Anophéline** qui est un peptide anti-coagulant. Une seule protéine (comme l'apyrase) peut avoir plusieurs rôles anti-hémostatiques comme plusieurs protéines peuvent jouer le même rôle dans l'hémostase.

III-3- Inhibition de la réaction inflammatoire

La salive des arthropodes hématophages intervient également dans l'inhibition de la réaction inflammatoire occasionnée par la destruction des tissus par leurs pièces buccales (Ribeiro *et al.*, 1991).

Les insectes possèdent au sein de leur salive des composés capables d'inhiber la sensation de douleur provoquée par la piqûre et perçue par l'hôte. La salive de *Triatoma infestans*

inhibe l'activité des canaux à sodium au niveau des nerfs et donc la sensation de la douleur par l'hôte (Dan *et al.*, 1999). Des composants salivaires ayant des effets anti-nociception comme l'apyrase (diminue le niveau d'ATP), anti-histamine et des protéines se liant à la sérotonine sont retrouvées dans la salive des tiques et des triatomes (Paesen *et al.*, 1999). La salive des moustiques entraîne chez leur hôte une augmentation locale du débit sanguin, de la perméabilité vasculaire et de l'infiltration de certaines cellules telles que les neutrophiles (Demeure *et al.*, 2005). On a aussi trouvé chez *An. stephensi* une protéine D7 forme courte de 16kDa, l'hamadarine, qui inhibe le système contact en empêchant l'activation réciproque entre le facteur XIIa et la kallikréine en présence de Zn2+ (Isawa *et al.*, 2002).

Ce chapitre sera étendu en détail dans le chapitre **III-4-1 « Modulation de la réponse immune de l'hôte par la salive des arthropodes »**

III-4- Propriétés immunologiques de la salive des arthropodes

L'exposition à la salive induit chez l'hôte vertébré des réponses immunes innée et adaptative, spécifique et non spécifique, qui mobilisent plusieurs éléments tels que les cellules phagocytaires et présentatrices d'antigène (CPA), les cellules productrices des cytokines, des lymphocytes T (LT) et B (LB) et le complément (voie classique et voie alternative) (**Figures 24** et **28**). La conséquence majeure de la mobilisation de cette artillerie est le développement, lors d'expositions ultérieures, de puissantes réactions cellulaires (Hypersensibilité retardé) et/ou humorale chez l'hôte, altérant ainsi le site de piqûre et aboutissant au rejet de l'ectoparasite (Wikel, 1982). Les arthropodes hématophages ont ainsi sélectionné dans leur salive des substances ou des facteurs ayant des propriétés immunomodulatrices pouvant contrer ces réactions immunes de l'hôte et faciliter ainsi le bon déroulement de leur repas sanguin (Gillespie *et al.*, 2000). En complément, l'induction d'une immunomodulation locale peut, par un effet adjuvant ou immunosuppresseur, influencer le développement des réponses immunes de l'hôte (**Figure 28**). En effet, certaines protéines salivaires sont capables de moduler l'activation des macrophages et la présentation d'antigènes (Brunelleschi *et al.*, 1990a; Brunelleschi *et al.*, 1990b; Eglezos *et al.*, 1991) ou d'inhiber l'action des cytokines et cellules immunitaires (Konik *et al.*, 2006; Wikel, 1996). Ceci peut ainsi avoir des conséquences sur la transmission des pathogènes et le développement des pathologies associées (Titus *et al.*, 2006). La durée du contact homme-vecteur (tiques plusieurs jours et moustiques quelques minutes) ainsi que la manière de prélever le sang (telmophagie ou

solénophagie) influencent alors les effets immunomodulateurs induits par la salive de ces vecteurs.

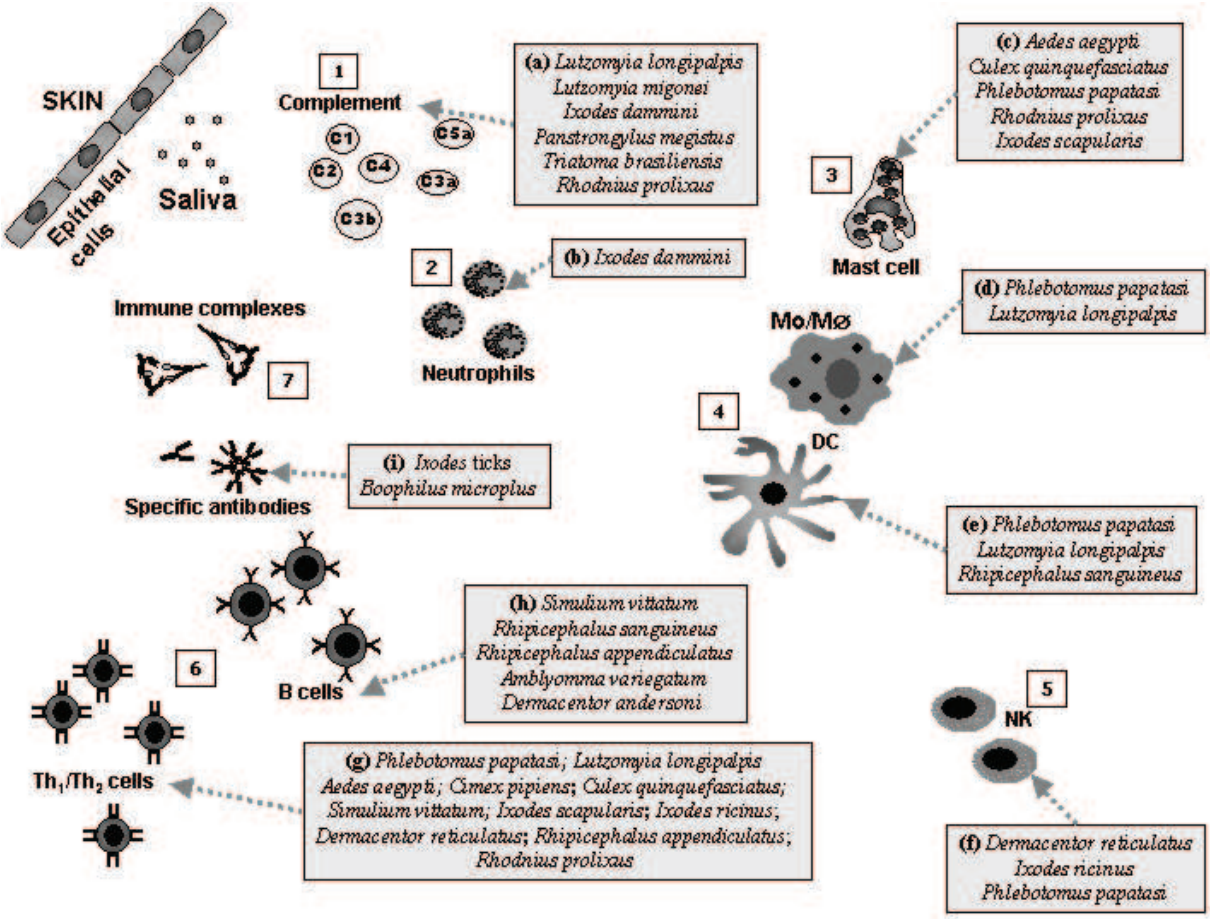


Figure 28: Modification des réponses immunes innée et adaptative par la salive des arthropodes hématophages. D'après (Andrade *et al.*, 2005).

III-4-1- Modulation de la réponse immune de l'hôte par la salive des arthropodes

Les caractéristiques modulatrices de la salive des arthropodes sur la réponse immune de leurs hôtes sont relativement bien décrites pour des maladies telles les leishmanioses, la borréliose de Lyme, la maladie de Chagas (Brossard and Wikel, 1997; Kamhawi, 2000; Kovar, 2004; Sacks and Kamhawi, 200; Schoeler and Wikel, 2001). Différentes types de molécules immunomodulatrices ont été décrites dans la salive d'arthropodes vecteurs de maladies. La plupart de ces médiateurs agissent directement ou indirectement sur des cellules effectrices du système immunitaire comme les macrophages, les LT et les LB, les cellules NK et les granulocytes.

Les données les plus avancées concernent l'influence de la piqûre du phlébotome, vecteur de la leishmaniose, sur la réponse immune locale (Gillespie *et al.*, 2000). La salive des phlébotomes *Lutzomia longipalpalis* et *Phlebotomus papatasi* module la réponse immunitaire innée et adaptative de l'hôte. En effet, les protéines salivaires de ces vecteurs peuvent réguler la production de cytokines de type Th1 (IFN-γ, TNF-α, IL-2, IL-12,…) et Th2 (IL-4, IL-5, IL-10,…) et jouer ainsi un rôle clé dans la protection ou susceptibilité à l'infection (Mbow *et al.*, 1998). La dichotomie Th1/Th2 a été clairement observée dans la protection/pathologie de la leishmaniose. La réponse de type Th1 est associée à une immunité protectrice tandis que la réponse type Th2 est associée à l'infection du parasite et à la pathologie de la leishmaniose (Alexander *et al.*, 1999; McSorley *et al.*, 1996). Les extraits salivaires de phlébotomes inhibent d'une manière générale la réponse Th1 par une inactivation des lymphocytes T (LT) et une baisse de la production d'interleukine-12 (IL12) et d'interféron-γ (IFN-γ) (Hall and Titus, 1995). Cet effet immunosuppresseur est associé à une augmentation de la production d'IL4 (cytokine Th2) qui bloque la destruction des parasites par les macrophages (Titus *et al.*, 1994). Dans des modèles expérimentaux murins, l'inoculation par une seringue (sans salive) d'une quantité de leishmanies similaire à celle injectée lors d'une piqûre naturelle (entre 10 et 1000 parasites) n'induit pas la pathologie attendue (Menon and Bretscher, 1996). Il faut des millions de parasites pour observer une infection accompagnée, dans de rares cas, de petites lésions cutanées chez la souris comparées à celles observées lors d'une co-injection du même nombre de parasites en présence de la salive de phlébotomes (Titus and Ribeiro, 1988). Ces deux observations suggèrent que la salive des phlébotomes, du fait de son effet immunomodulateur sur la réponse immune de l'homme, semble nécessaire au développement de la pathologie. En effet, la salive des phlébotomes inhibe la capacité des macrophages à présenter les antigènes aux LT (Theodos *et al.*, 1991a) et à produire du H_2O_2 et du NO (Hall and Titus, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999; Waitumbi and Warburg, 1998), substances ayant une action anti-parasitaire, d'où l'exacerbation de la pathologie notée. Cet effet facilitateur n'a été retrouvé qu'après des injections de quantité de salive proche de celle injectée lors de la piqûre naturelle (Theodos *et al.*, 1991b). La salive de *P. papatasi* est capable aussi d'inhiber l'activité des cellules NK (Rabarison *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 1999; Waitumbi and Warburg, 1998) et celle de *L. longipalpalis* capable d'inhiber les voies classique et alternative du complément (Cavalcante *et al.*, 2003). Enfin, des études ont montré que le Maxidilan (MAX), petit peptide de 7 kDa, principal vasodilatateur de *Lu. longipalpalis,* est capable d'induire le même effet immunomodulateur que les extraits salivaires totaux. En effet, le MAX peut inhiber l'expression du Tumor Necrosis Factor-α (TNFα) par les macrophages et

augmenter la production de cytokines IL-4 et Il-10 ainsi que des prostaglandines E2 (Bissonnette *et al.*, 1993; Bozza *et al.*, 1998; Lanzaro *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 1998). L'administration locale de MAX induit des érythèmes cutanés et inhibe la réaction d'hypersensibilité de l'hôte ainsi que l'activation des LT (Qureshi *et al.*, 1996). Il peut aussi inhiber la production de NO (Gillespie *et al.*, 2000; Hall and Titus, 1995) et de H_2O_2 par les macrophages et augmenter la sécrétion de l'IL-10 (Bissonnette *et al.*, 1993). Le MAX inhibe alors la réponse Th1 et favorise une réponse Th2, permettant ainsi la survie des *Leishmania* et le développement de la pathologie (Rogers and Titus, 2003). L'exemple du MAX (petit peptide) montre que l'effet des extraits salivaires totaux (ou salive total) d'un arthropode hématophage peut être assuré par une seule protéine salivaire.

Chez les tiques, vecteurs de différentes maladies telles que la borréliose de Lyme, la salive détourne à la fois la réponse innée (voie alternative du complément et cellules NK) et la réponse adaptative (RI à médiation cellulaire et humorale) de l'hôte (Ribeiro, 1987a). Une des particularités des piqûres de tiques est que ces arthropodes restent au contact de leur hôte pendant des semaines et donc doivent résister aux défenses de leur hôte (Brossard *et al.*, 1982). Ainsi, un grand répertoire d'activités immunosuppressives leurs permettant de faire face aux mécanismes de défense de leurs hôtes a été décrit. L'injection de salive ou d'extraits de glandes salivaires de différentes espèces de tiques dures entraîne, *in vitro*, grâce à leurs prostaglandines E2 salivaires, une réduction de l'activité des lymphocytes vis-à-vis de mitogènes (Ferreira and Silva, 1998; Fuchsberger *et al.*, 1995; Ramachandra and Wikel, 1992; Urioste *et al.*, 1994). La salive d'*Ixodes scarpularis*, vecteur de la borréliose de Lyme, est capable d'inhiber l'action des neutrophiles de l'hôte (Ribeiro *et al.*, 1990), de réguler négativement des cytokines inflammatoires (IL-1, et TFN-α) et de l'IL-2 (Gillespie *et al.*, 2000) qui est une cytokine nécessaire à l'activation directe les LT, les LB, les macrophages et les NK (Smith, 1992; Theze *et al.*, 1996). Cette inhibition de la prolifération des lymphocytes du fait de l'inhibition de la sécrétion d'IL-2 a été aussi décrite chez *Ixodes ricinus* (Urioste *et al.*, 1994). L'injection d'extraits salivaires de différentes tiques *Rhipicephalus* à des souris entraîne une réduction de l'expression de l'IFN-α, du TNF-α, de l'IL-1, de l'IL-5, de l'IL-6, de l'IL-7 et de l'IL-8 (Fuchsberger *et al.,* 1995) et une augmentation de la production de cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, de l'IL-10 et de TGF (« transforming growth factor-β ») (Ferreira and Silva, 1999), inhibant ainsi la prolifération des cellules des nodules lymphatiques. Une réduction voire une inhibition de la différentiation et de la maturation des cellules dendritiques (issues des cellules présentatrices d'antigènes et des monocytes), suite a une réduction de l'expression de molécules co-stimulatrices (CD80, CD86, HLA-DR, et p38

MAP knases), ont été rapportées après une injection d'extraits de glandes salivaires de tiques (Cavassani *et al.*, 2005; Costa *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2010). Chez *Dermacentor andersoni,* c'est une protéine d'environ 30 kDa qui est responsable d'un effet suppresseur de la prolifération et de l'activité des lymphocytes (Bergman *et al.*, 1995 and 1998). De plus, une réduction de l'expression de certaines molécules d'adhésion des leucocytes, telles que les intégrines, a été rapportée chez des souris après l'injection de la salive de *Dermacentor andersoni* (Macaluso and Wikel, 2001). D'autres protéines de la salive des tiques capables d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes ont été identifiées: la p36, l'Iris, la Salp15 et la « IL-2-Binding protein » (Titus *et al.*, 2006).

La salive des simulies, vecteurs de l'onchocercose, présente également des propriétés immunosuppressives sur l'activité des cellules immunitaires. L'inoculation des extraits salivaires de *Simulium vittatum* inhibent *in vivo* la capacité des cellules immunes à présenter les antigènes, en diminuant l'expression des molécules du CMH de type II, et *in vitro* la mitogénèse des lymphocytes T et B chez des souris (Cross *et al.*, 1993). Ceci est accompagné d'une augmentation d'IL-4, IL-5 et d'Il-10 (Cross *et al.*, 1994).

Des effets immunomodulateurs entraînant une suppression de la prolifération des lymphocytes ont aussi été notés dans la salive de *Rhodnius prolixus* (Kalvachova *et al.*, 1999), important vecteur de *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie de Chagas.

Chez les moustiques, il a été montré que les extraits salivaires totaux d'*Aedes aegypti* inhibaient la production de cytokines de type Th1 et la prolifération des LT et LB (Zeidner *et al.*, 1999). Chez *Aedes aegypti* et *Culex quinquefasciatus*, les vasodilatateurs sialokinine 1 et 2 augmentent la production d'IL-4 et d'IL-10, cytokines de type Th2 (Zeidner *et al.*, 1999), et modifient ainsi l'activation des macrophages et la présentation des antigènes (Brunelleschi *et al.*, 1990b), ce qui facilite le probing (la prise de sang ne dure que quelque minutes). Plus récemment, le rôle immunomodulateur de la salive des espèces d'*Anopheles* a été rapporté (Owhashi *et al.*, 2003). Ces auteurs ont en effet identifié un facteur présentant une activité attractive pour les neutrophiles mais non pour les éosinophiles, le « Neutrophil Chemotactic Factor » (NCF) qui pourrait être impliqué dans la réaction inflammatoire locale par l'accumulation de neutrophiles au niveau du site de piqûre. Cette protéine jouerait aussi un rôle dans l'orientation des réponses immunes et serait source de production d'IL-10 et IL-12 impliquées dans les réactions inflammatoires de l'hôte au moment de la piqûre (Owhashi *et al.*, 2003). Cependant, une étude récente a montré que la salive d'*An. stephensi* entraînerait plutôt une réponse immune de type Th1 protectrice avec augmentation de la production d'IFN-γ, d'IL-12 et d'oxyde nitrique synthétase (Donovan *et al.*, 2007).

Il apparaît donc que les composantes salivaires de la plupart des arthropodes hématophages (Phlébotomes, tiques, glossines, simulies, moustiques,…) favorisent, d'une manière générale, la mise en place d'une réponse immunitaire de type Th2 et l'inhibition de la réponse Th1 créant ainsi **i)** un microenvironnement favorable au pathogène, **ii)** leurs permettant de rester en contact aussi longtemps possible avec leur hôte et **iii)** de prendre ainsi un repas sanguin complet.

Cependant, certains mécanismes de cette immunomodulation semblent être différents en fonction de l'espèce vectorielle étudiée. Ainsi, *L. longipalpis* (phlébotome du nouveau monde) et *P. papatasi* (phlébotome de l'ancien monde) peuvent développer des stratégies différentes pour moduler la réponse immune de l'hôte, malgré leur proximité phylogénétique. En effet, la salive de *P. papatasi* présente des effets immunomodulateurs similaires de ceux de *L. longipalpis* mais deux importantes différences ont été observées : la salive de *P. papatasi* augmente le taux d'IL-4, cytokine de type Th2 et n'a pas d'effet sur la production de TNF-α. Alors que la salive de *L. longipalpis* augmente, en plus de l'IL-4, le taux de TNF-α et de l'IL-10 (cytokine Th2). L'IL-4 stimule la différentiation des cellules de types Th2 et supprime le développement des cellules de type Th1 afin de prévenir le développement d'une réponse inflammatoire (Rohousova and Volf, 2006). Ceci pourrait notamment jouer un rôle sur les différences observées dans les manifestations cliniques des leishmanioses viscérales en fonction des zones géographiques américaines (Warburg *et al.*, 1994). De même, chez les moustiques, il a été démontré chez les souris, que la salive d'*Aedes aegypti* et de *Culex quinquefasciatus*, deux espèces de culicidés, diffèrent dans leur activité d'immunomodulation (Wanasen *et al.*, 2004). Les extraits salivaires totaux d'*Aedes aegypti* inhibent la prolifération des LT et la production de cytokines de type Th1 et Th2 après stimulation antigénique spécifique (ovalbumine) ou non spécifique (mitogène), effet qui n'a pas été retrouvé avec les extraits salivaires de *Culex quinquefasciatus*. Chez les moustiques *Anopheles*, la salive favoriserait le développement d'une réponse de type Th1 protectrice (Donovan *et al.*, 2007) contrairement aux réponses obtenues avec les extraits de moustiques *Culex* et *Aedes*. Ces travaux semblent donc indiquer que les propriétés immunomodulatrices de la salive des moustiques varient en fonction du genre ou de l'espèce d'arthropode.

Mais il apparaît que l'orientation vers un type Th1 ou Th2 est dépendante du nombre et de la durée des expositions (Mbow *et al.*, 1994).

III-4-2- Salive des arthropodes, transmission de pathogènes et développement de l'infection

Les protéines salivaires, par leurs propriétés immuno-modulatrices, occasionnent un changement de la physiologie locale de l'hôte pouvant avantager ou désavantager les parasites, bactéries et virus (vivant dans le tractus digestif du vecteur arthropode) injectés avec la salive lors d'une piqûre, et donc l'infection de l'hôte vertébré (Andrade *et al.*, 2005; Belkaid *et al.*, 1998; Ribeiro, 1989).

Ainsi, divers travaux ont montré que des piqûres infectantes ou la co-inoculation d'extraits salivaires de *L. longipalpalis* (ou du MAX) et des *Leishmania major* (parasites), chez des souris, augmentaient l'infection par *L. major* qui se manifestait par une augmentation de la taille des lésions cutanées et du nombre de parasites dans ces lésions (Lima and Titus, 1996; Morris *et al.*, 2001; Theodos *et al.*, 1991b; Titus and Ribeiro, 1988; Warburg *et al.*, 1994). La salive de *L. longipalpalis* semblerait induire chez l'hôte, par un mécanisme inconnue, une réponse Th2 inefficace à la suppression ou clearance des leishmanies et faciliterait leur multiplication dans les macrophages cutanés de l'hôte vertébré (Alexander *et al.*, 1999; Solbach and Laskay, 2000; Zer *et al.*, 2001). Des effets similaires ont été rapportés avec la co-injection d'extraits salivaires de *P. papatasi* et *P. duboscqi* et de *L. donovani* (Mbow *et al.*, 1998; Zer *et al.*, 2001). Cependant, cette exacerbation de la pathologie de leishmaniose cutanée, sous l'effet de la salive du vecteur, pouvait être due au fait que les phlébotomes utilisés dans ces études étaient des souches de laboratoire. En effet, des études récentes ont montré que les lésions cutanées occasionnées par la co-injection salive de *L. longipalpalis* et parasites (*L. amazonensis*) sont moins importantes avec les souches sauvages (récoltées sur le terrain) comparées aux souches élevées en laboratoire (Laurenti *et al.*, 2009a; Laurenti *et al.*, 2009b).

Les tiques sont responsables de nombreuses maladies infectieuses qu'elles transmettent avec leur salive : les borrélioses et les rickettsioses (Burgdorfer, 1977), les babésioses (Spielman *et al.*, 1985), les ehrlichioses (Magnarelli *et al.*, 1995), les encéphalites (Telford *et al.*, 1997)… L'influence de la salive des tiques sur la transmission de pathogènes et le développement des infections a été assez étudiée. Chez *Rhipicephalus appendiculatus* et *Amblyomma variegatum*, la salive favorise la transmission du virus de Thogoto d'une tique infectée à une tique non infectée (Davies *et al.*, 1990). Les extraits de glandes salivaires de *R. appendiculatus* augmente le pouvoir de cette tique à prendre, durant son repas sanguin sur un hôte infecté, des sporozoïtes de *Theileria parva* parasitant les lymphocytes et les marcophages

de l'hôte (Shaw *et al.*, 1993). La salive de *Dermacentor reticularis* peut, en agissant sur les fonctions des cellules NK et sur le réseau de cytokines de l'hôte, favoriser la transmission d'arbovirus (Hajnicka *et al.*, 2005). La salive de la tique *Ixodes scapularis* provoque la suppression de la production de cytokines Th1 et l'augmentation de la sécrétion de cytokines Th2 favorisant ainsi la transmission et le développement de *Borrelia burgdorferi* (Schoeler *et al.*, 1999; Zeidner *et al.*, 1997). Des effets similaires sur la transmission et le développement de *B. lusitaniae* et *B. afzelii* ont été observés avec les extraits de glandes salivaires d'*Ixodes ricinus* (Pechova *et al.*, 2002; Zeidner *et al.*, 2002).

Par contre peu de travaux ont été menés sur le rôle de la salive de moustiques, vecteurs des parasites du paludisme, de filarioses et de nombreux arbovirus, dans la transmission et le développement de pathogènes. L'injection de virus de Cache-Valley à des souris, après que ces dernières aient été piquées par *Ae. egypti*, *Ae. triseriatus* ou *Culex pipiens*, était suivie d'une augmentation de l'infection chez ces souris (Edwards *et al.*, 1998). La co-inoculation d'extraits de glandes salivaires *d'Ae. aegypti* et de virus de Sindbis provoque une réduction de la production IFN-β comparée à l'inoculation des virus seuls ; réduction pouvant entraîner une susceptibilité de l'hôte à l'infection par ce virus (Schneider *et al.*, 2004). La co-inoculation, chez des poules, de sporozoïtes de *Plasmodium gallinaceum* et d'extraits de glandes salivaires d'*Ae. fluviatillis* a montré un fort taux de parasitémie comparé à celui des poules n'ayant reçu que l'injection de sporozoïtes (Rocha *et al.*, 2004). Des souris ayant reçu une inoculation de virus de West Nile (VWN), après exposition aux piqûres de moustiques, avaient développé progressivement une infection et une virémie beaucoup élevée que celles qui ont reçu une inoculation de VWN seuls (Schneider *et al.*, 2006). De plus, la co-inoculation de salive de moustiques et de VWN accélérait et amplifiait l'infection (Schneider *et al.*, 2006). A l'inverse, il a aussi été montré que la salive *d'Ae. aegypti* inhibe l'infection et le développement du virus de la dengue dans les cellules dendritiques hôtes et que cet effet est renforcé par des expositions répétées aux piqûres de ce vecteur (Ader *et al.*, 2004). De plus, il a été montré que l'injection de *P. yoelii* à des souris, après pré-exposition aux piqûres non infectantes d'*An. stenphensi*, empêchait le développement de ce parasite (Donovan *et al.*, 2007).

Les résultats des travaux portant sur les effets de la salive des moustiques restent donc mitigés, mais la tendance générale est une mise en place permissive à la transmission des pathogènes et au développement des infections qu'ils occasionnent (Schneider and Higgs, 2008).

III-4-3- Salive des arthropodes et réponse immune anti-pathogène

Peu d'études se sont intéressées au pouvoir immunomodulateur de la salive d'arthropodes sur le développement et l'orientation de la réponse immune spécifique aux pathogènes transmis lors d'une piqûre infectante dans un contexte homologue (exemple : *Anopheles* et *Plasmodium* ou *Aedes* et arboviroses). En revanche, dans un contexte hétérologue (*Anopheles* et pathogènes non transmis par ce vecteur = pathogènes/antigènes irrelevants) une étude suggère que la salive des tiques oriente la réponse immunitaire vers un type Th2 qui pourrait moduler la réponse immune contre des pathogènes non transmis par les tiques. En effet, il a été montré que la salive des tiques inhibait *in vitro* l'action trypanocide des macrophages sur *Trypanosoma cruzi* (Ferreira and Silva, 1998). La salive des arthropodes vecteurs aurait également un rôle immunomodulateur sur la réponse immune à des antigènes non spécifiques ou étrangers. Par exemple, la salive de tiques inhibe la production d'Ac contre la BSA (Bovine Serum Albumine) utilisée ici comme antigène irrelevant co-injecté chez l'hôte avec la salive (Fivaz, 1989).

Par ailleurs, dans des modèles murins, la co-injection de salive de glossine et d'ovalbumine chez des souris inhibe la réponse IgG spécifique à l'ovalbumine, suggérant que la salive des glossines a un effet suppresseur sur les réponses des LB et LT spécifiques aux antigènes hétérologues (Caljon *et al.*, 2006).

Il a été observé, dans un contexte épidémiologique, que la réduction des cas de virus « Human Herpes Virus 8 », l'agent pathogène responsable du sarcome de Kaposi et transmis essentiellement par la salive humaine, était corrélée avec la réduction des populations de vecteurs en Italie (Coluzzi *et al.*, 2003). Ceci a poussé ces auteurs à suggérer que l'immunomodulation locale induite par la salive de moustiques *Anopheles* pourrait favoriser la transmission du HHV8. En Afrique, la transmission du HHV 8 peut avoir lieu lorsque les mères appliquent leur salive sur les blessures des enfants telles que des piqûres d'insectes. L'immunomodulation induite par la salive du vecteur au site même pourrait créer un micro-environnement (une hypersensibilité locale ou une immunosuppression) favorable au développement du virus transmis de la mère à l'enfant via la salive (Remoue *et al.*, 2005).

Enfin, une différence de réponse IgG anti-*Plasmodium* chez des enfants exposés différemment aux piqûres des anophèles a été observée entre 2 villages. En effet, un des villages présentait une forte exposition à *An. gambiae* (village de Mboula) et l'autre une faible exposition à *An. funestus* (village de Gankette Balla). Sur une année de suivi, les auteurs ont observés que les réponses IgG anti-*P. falciparum* **i)** étaient significativement plus élevées à Mboula comparé à Gankette Balla et **ii)** variaient en fonction de la saison d'exposition (pic en

décembre) à Mboula, contrairement au village exposé à *An. funestus* (Gankette Balla) où les réponses IgG spécifiques restaient stables tout au long de l'année. Les auteurs ont ainsi suggéré que l'intensité d'exposition et/ou la nature des piqûres (*An. gambiae* ou *An. funestus*) pourraient influencer la réponse Ac contre les pathogènes (Sarr *et al.*, 2007). De plus, une modulation différente des réponses isotypiques (IgG1 et IgG3) a été constatée entre ces deux villages. En effet, les individus vivant à Gankette Balla présentaient majoritairement une réponse IgG3 anti-*P. falciparum* comparés à ceux de Mboula. En revanche, les réponses IgG1 anti-*P. falciparum* restaient significativement prédominantes à Mboula (Sarr *et al.*, 2007). Malgré cette immuno-modulation différente entre les 2 villages, une baisse progressive et significative des réponses IgG anti-peptides (y compris la CSP) de *P. falciparum* au cours de la saison a été observée, particulièrement chez les enfants non-infectés, et ceci quelque soit le village (Sarr *et al.,* soumis). Cette baisse semblait être associée à une augmentation du niveau d'exposition aux anophèles vecteurs (*An. funestus, An. gambiae s.l.*) surtout dans le village de Gankette Balla (à faible exposition à *An. funestus*) comparé à Mboula (forte exposition saisonnière à *An. gambiae s.l.*) (Sarr *et al.,* soumis).

III-5- Autres rôles des protéines salivaires

Les moustiques mâles et femelles utilisent les sucres comme source énergétique pour le métabolisme de base (vol, reproduction et fonctions somatiques) (Foster, 1995). Ils se nourrissent de tissus vasculaires des plantes, de jus sucré, de nectar de fleurs et de miellat (Moore *et al.*, 1987). La salive des moustiques mâles et femelles permet la solubilisation, l'ingestion et la digestion des oligosaccharides retrouvés au cours des repas sucrés (Grossman *et al.*, 1997; Marinotti *et al.*, 1996).

Chez les tiques, la fonction majeure des glandes salivaires est le contrôle de l'osmorégulation (Sauer *et al.*, 1995). Le sang est une source de nourriture diluée, certains insectes doivent concentrer les nutriments en réabsorbant l'eau.

La salive de l'anophèle contient des molécules qui sont indispensables à la poursuite du cycle du *Plasmodium* chez ce vecteur. La fusion des gamétocytes (fécondation) dans l'estomac de l'anophèle nécessite une étape préliminaire indispensable : l'exflagellation des microgamètes mâles. Lors de la prise du repas sanguin, le moustique réingère ainsi une partie de sa salive qui contient un facteur activateur de gamètes, le GAF (Gamete Activation Factor) (Hirai *et al.*, 2001).

L'apyrase, en plus de son rôle dans l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, intervient sur le comportement du vecteur infecté (Ribeiro *et al.*, 1985a). En effet, il semblerait que cette

protéine soit moins exprimée chez le vecteur infecté au cours d'un repas sanguin. Cette modification de la composition de la salive et donc du comportement de piqûre du vecteur infecté pourrait permettre aux parasites d'augmenter leur transmission chez l'hôte. En effet, le temps du repas, celui de la salivation et le nombre de piqûres sont augmentés chez un vecteur infecté, ce qui faciliterait la dissémination du pathogène à plusieurs hôtes (Ribeiro *et al.*, 1985a; Rossignol *et al.*, 1984; Wekesa *et al.*, 1992). Il a été aussi remarqué que les anophèles infectés par *Plasmodium* font des repas sanguins tout au long de la nuit, tandis que les non infectés piquent rarement plus d'une fois par nuit (Mathews *et al.*, 1996). Les auteurs semblent s'accorder pour statuer sur le caractère adaptatif des comportements résultant d'une co-évolution entre les parasites et les vecteurs (Poulin, 1995).

Les glandes salivaires ont elles-mêmes un rôle dans l'infection et donc la transmission des parasites à l'hôte par le vecteur. Lors de l'éclatement des oocystes, les sporozoïtes gagnent tous les tissus avec un tropisme préférentiel pour les glandes salivaires. Des récepteurs spécifiques jouent un rôle dans la reconnaissance et l'invasion de ces glandes par les plasmodiums (Brennan *et al.*, 2000). Les glandes salivaires interviennent également dans la maturation des sporozoïtes et l'acquisition de leur pouvoir infectieux (Touray *et al.*, 1994).

III-6- Etude du transcriptome/Sialome des glandes salivaires et leurs applications

III-6-1- Techniques de l'étude du Sialotranscriptome des Arthropodes

Les glandes salivaires des arthropodes hématophages expriment un cocktail de molécules à rôles anti-hémostatique et immunomodulateur afin de les aider à localiser le vaisseau sanguin et prendre leurs repas sanguins (Ribeiro *et al.*, 1995). Durant cette dernière décennie, les progrès techniques dans le domaine de la biologie moléculaire ont rendu possible le séquençage de presque la totalité du génome, y compris les transcrits des glandes salivaires (Charlab *et al.*, 1999), de la plupart des vecteurs de maladies tels que *An. gambiae* (Holt *et al.*, 2002). Cependant, ces techniques d'enrichissement spécifique de molécules par PCR nécessitent des protocoles assez lourds ne permettant pas d'obtenir les séquences entières (elles permettent d'obtenir que des fragments le plus souvent) (Charlab *et al.*, 1999). Les techniques explorant les protéomes et les transcriptomes se sont alors développées et ont permis d'identifier et de caractériser différents gènes ou transcrits codant diverses protéines des glandes salivaires (le sialome) de différents arthropodes hématophages tels que les moustiques *Anopheles gambiae* (Arca *et al.*, 1999; Arca *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2006b;

Francischetti *et al.*, 2002b; Lanfrancotti *et al.*, 2002), *Anopheles funestus* (Calvo *et al.*, 2007), *Anopheles darlingi* (Calvo *et al.*, 2009), *Aedes aegypti* (Ribeiro *et al.*, 2007, Valenzuela *et al.*, 2002b), *Aedes albopictus* (Arca *et al.*, 2007), *Triatoma brasiliensis* (Santos *et al.*, 2007), *Triatoma infestans* (Assumpcao *et al.*, 2008), *Glossina morsitans* (Alves-Silva *et al.,* 2010; Van Den Abbeele *et al.*, 2007), *Culicoides nubeculosus* (Langner *et al.*, 2007) et *Xenopsylla cheopis* (Andersen *et al.*, 2007). Néanmoins la fonction de la plupart de ces protéines identifiées reste peu connue ou inconnue même si leur sécrétion lors de la piqûre ne fait aucun doute (Ribeiro and Francischetti, 2003).

Certaines techniques sont basées sur le séquençage aléatoire de clones dérivés de banque d'ADNc des glandes salivaires (Valenzuela *et al.*, 2002b) (**Figure 29**).

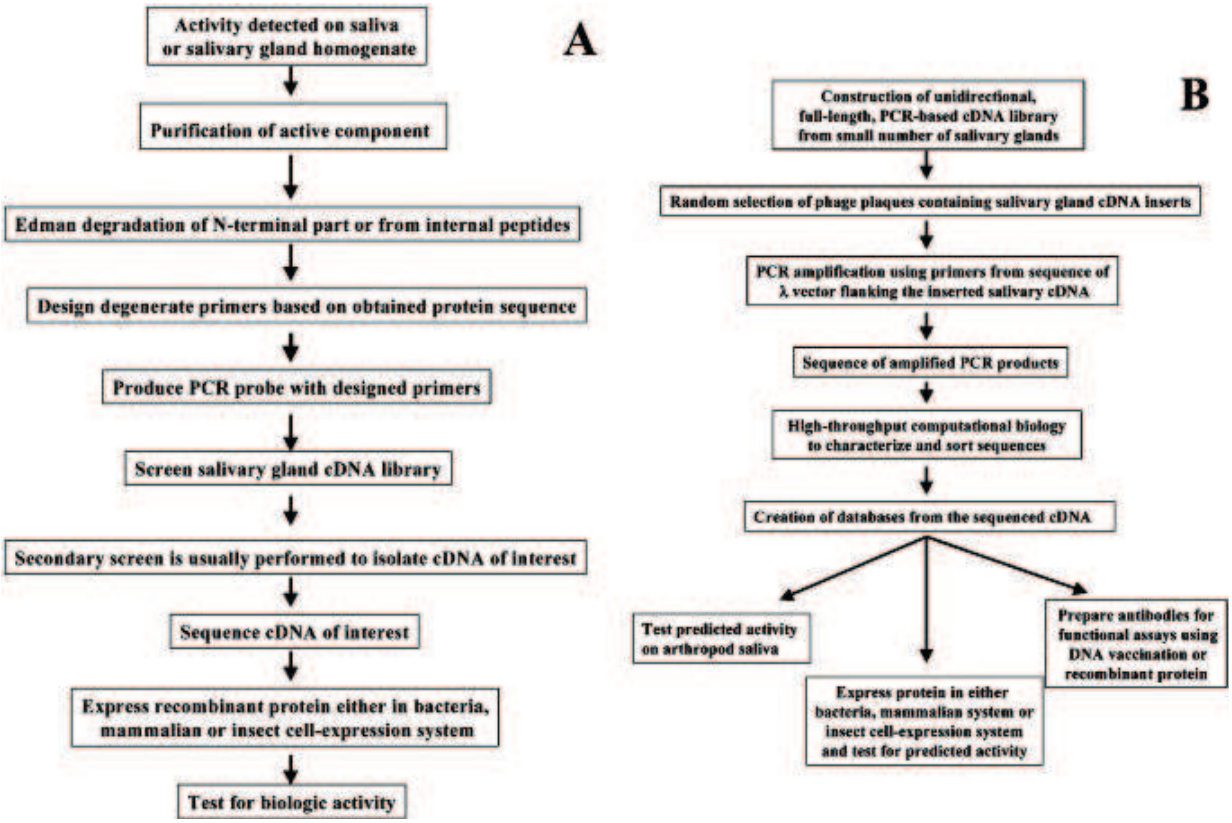


Figure 29 : Protocoles (A) et stratégies (B) utilisés pour isoler et caractériser les protéines ou les ADNc salivaires des insectes vecteurs. D'après (Valenzuela *et al.*, 2002b)

D'autres techniques peuvent être utilisées. On peut en citer l'analyse protéomique (**Figures 30 et 31**) des glandes salivaires qui est basée sur la séparation des protéines salivaires par des gels électrophorétiques couplée à une analyse par spectrométrie de masse permettant d'identifier les protéines dans les banques de données en fonction des spectres de masse (Choumet *et al.*, 2007; Francischetti *et al.*, 2002b; Kalume *et al.*, 2005b).

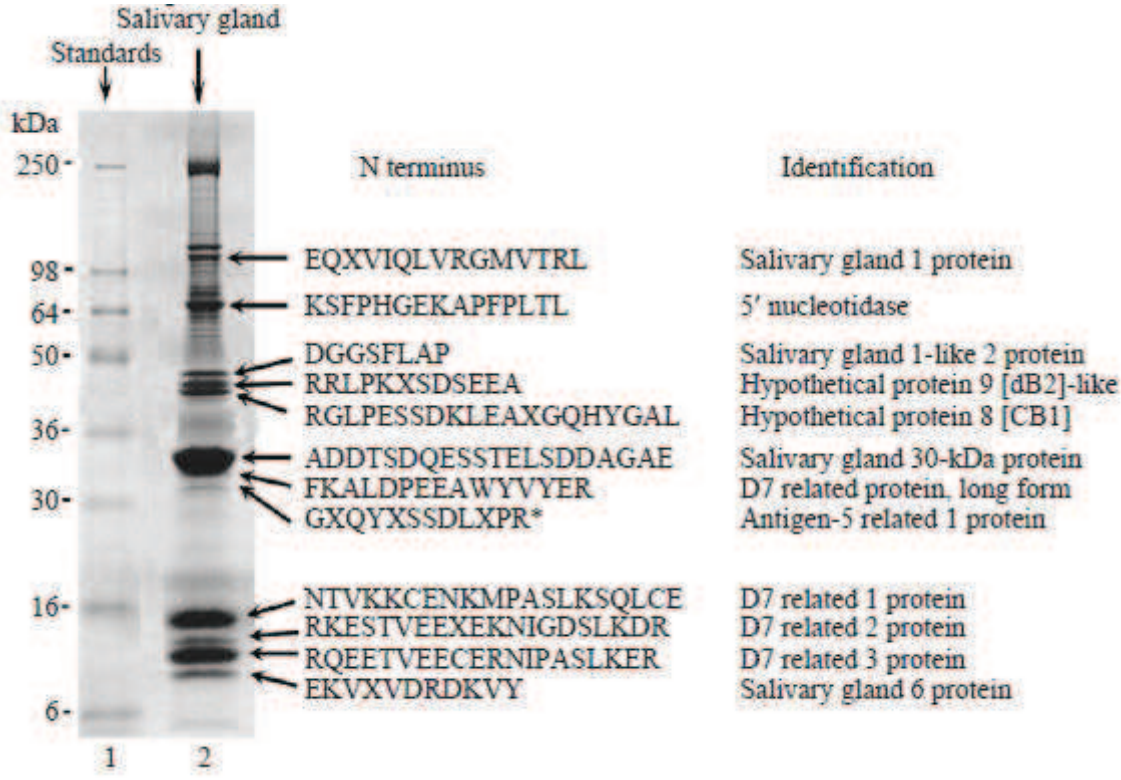


Figure 30 : Analyse protéomique des glandes salivaires d'*An. gambiae* par électrophorèse (gel 1D) et par séquençage d'Edman. D'après (Francischetti *et al.*, 2002b).

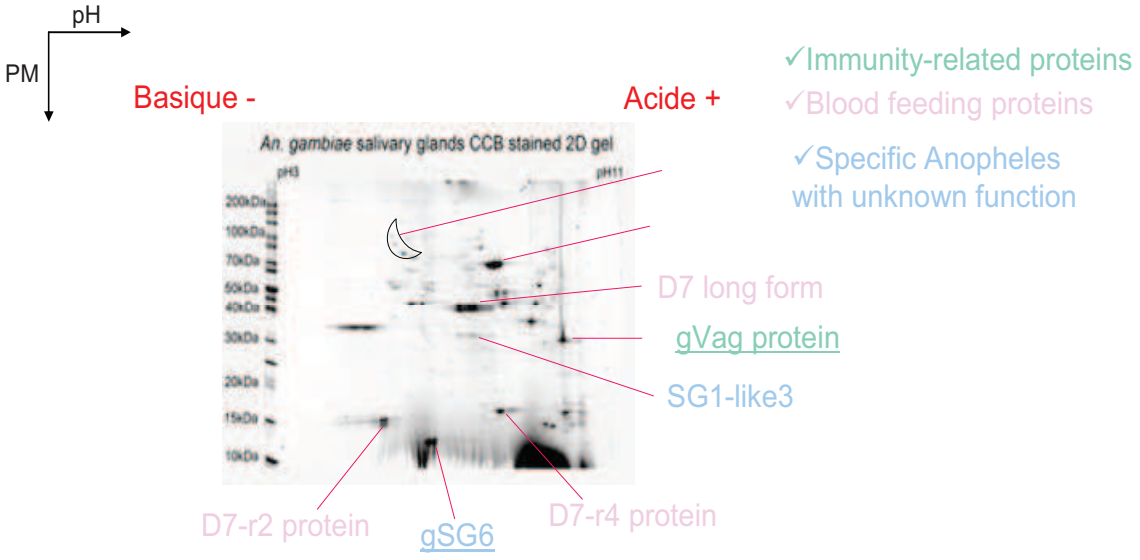
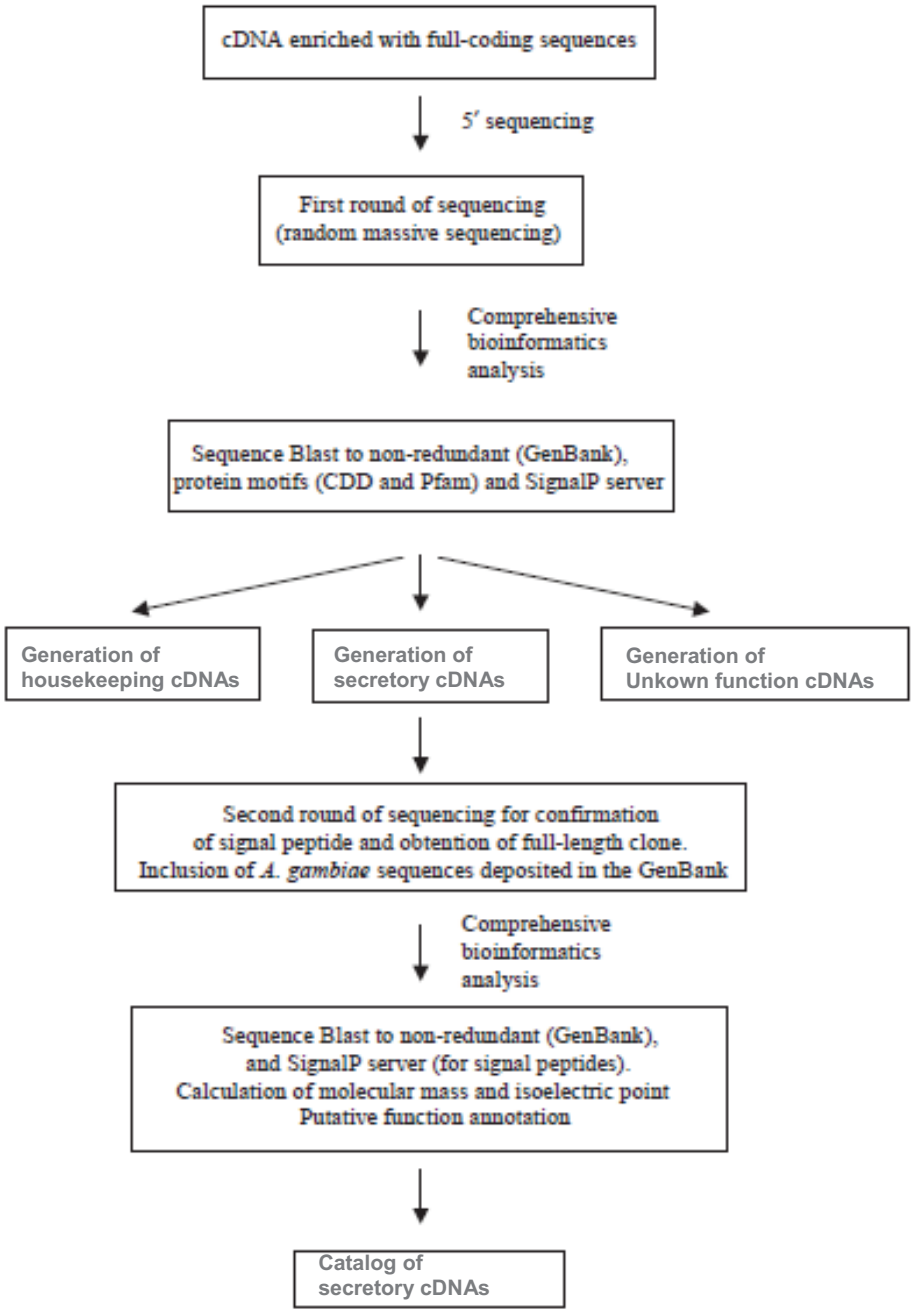


Figure 31 : Analyse protéomique des glandes salivaires d'*An. gambiae* par électrophorèse (gel 2D) (S. Cornelie, IRD Montpellier)

Le processus classique d'étude des fonctions des produits des glandes salivaires commence par la mise en évidence d'une activité biologique dans les extraits totaux de glandes salivaires, puis l'identification de ou des protéines responsables de cette activité et

enfin, la description de la séquence codante pour la structure primaire de la protéine concernée (Arca *et al.*, 2005; Valenzuela *et al.*, 2002b).



<u>Figure 32</u> : Analyse bio-informatique de séquences (5' EST) issues d'une banque d'ADNc des glandes salivaires d'*An. gambiae.* D'après (Francischetti *et al.*, 2002b).

La banque d'ADNc enrichis d'*An. gambiae* a été construite. Les séquences 5' EST ont été systématiquement générées par des clones issus de cette banque et analysées. Les signal-peptides ont été prédits grâge à la soumission de séquences clusters au serveur SignalP, ce qui permet d'identifier les composants ADNc connus, secrétés (S) ou non secrétés (H), et inconnus (U) de la salive

Ces études permettent d'établir des catalogues d'ADNc/protéines et de décrire leurs caractéristiques. Des outils supplémentaires basés sur la bio-informatique permettent de comparer les séquences de ces protéines et de leur assigner des fonctions par homologie de séquences avec des protéines dont la fonction est déjà connue et référencée (**Figure 32**). La présence d'un peptide signal permet également de prédire si les protéines sont sécrétées ou bien retenues au niveau des glandes salivaires. Ces études permettent des comparaisons de composition des glandes salivaires entre les espèces et entre les différentes familles, permettant ainsi d'identifier des protéines communes ou spécifiques d'espèce (Francischetti *et al.*, 2002b).

L'ensemble de ces études transcripto-protéomiques et bio-informatiques permettent, en d'établir des catalogues d'ADNc codant les protéines des glandes salivaires et leurs caractéristiques, de générer des hypothèses explicatives sur l'évolution de l'hématophagie en générale et de découvrir de nouvelles substances à rôle anti-hémostatique ou inflammatoire ou à visée vaccinale (Valenzuela *et al.*, 2003).

III-6-2- Description du sialome d'*Anopheles*

Des études sur le transcriptome des glandes salivaires avec l'élaboration de banque d'ADNc, ont particulièrement ciblé les sialomes des femelles des principaux vecteurs de plasmodiums, dont *An. darlingi* (Calvo *et al.*, 2009)*, An. stephensi* (Valenzuela *et al.*, 2003), *An. funestus* (Calvo *et al.*, 2007) et *An. gambiae* (Arca *et al.*, 2005; Francischetti *et al.*, 2002b).

Chez *An. gambiae,* les prédictions ont permis d'identifier :

- des gènes codant pour des protéines non sécrétées permettant de faire fonctionner la machinerie cellulaire et intervenant dans le métabolisme énergétique ainsi que dans la synthèse de protéines (transcription, modification et export). Certains transcrits codent pour des récepteurs dont des protéines G pouvant intervenir dans les signaux de sécrétion de salive par les glandes salivaires (Zimmermann *et al.*, 2003). D'autres transcrits codent pour les composants de la matrice extra cellulaire, des facteurs de transcription (Arca *et al.*, 2005).
- une minorité de gènes codant pour des protéines assure les activités de transposition et la défense contre les bactéries telle que *Wolbachia* et pour des protéines à fonction inconnue (Arca *et al.*, 2005).
- 73 protéines exprimées au niveau des glandes salivaires, dont 71 d'entre elles secrétées lors du repas sanguin, et pour une dizaine d'entre elles, une fonction leur a été assignée (Arca *et al.*, 2005; Francischetti *et al.*, 2002b).

Parmi les protéines salivaires secretées correspondant aux gènes présentant un peptide signal on retrouve :

a- Des protéines de la famille des D7 dont le premier membre a été décrit chez *Ae. aegpti* (James *et al.*, 1991). Les protéines de cette famille sont retrouvées dans le sialome de presque tous les moustiques (Arca *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2002a). Elles sont présentes uniquement au niveau des glandes salivaires des femelles adultes (Arca *et al.*, 2005; Suwan *et al.*, 2002). Deux sous-familles existent : les formes courtes (15-20kDa) qui semblent uniquement retrouvées au niveau des moustiques et les formes longues (27-30 kDa) que l'on retrouve aussi chez les phlébotomes. *An. gambiae* possède 3 protéines de forme longue et 5 de forme courte (Arca *et al.*, 2005) tandis les phlébotomes et les culicoïdes possèdent uniquement des formes longues (Valenzuela *et al.*, 2002a). *Aedes aegypti* et *A. albopictus* possèdent 2 formes longues et 4 formes courtes (Arca *et al.*, 2007), ces protéines ont été identifiées comme les protéines majeures des glandes salivaires de ces vecteurs (James *et al.*, 1991).

La fonction de ces protéines reste incertaine, 2 hypothèses ont été évoquées : i) elles transporteraient des petites molécules hydrophobes intervenant dans la facilitation de la prise de sang, de l'inhibition de l'hémostase et de l'inflammation (Arca *et al.*, 2002; Valenzuela *et al.*, 2002a); ii) elles seraient aussi capables de capter des médiateurs de la réponse hémostatique de l'homme tels que la sérotonine, histamine, norepinephrine (Arca *et al.*, 2002; Calvo *et al.*, 2006b).

Ces protéines chez *Culex spp.* (Malafronte *et al.*, 2003) et *Aedes* (Wasinpiyamongkol *et al.*, 2010) sont immunogéniques.

b- Des protéines de la famille des antigènes (AG)-5 : les membres de cette famille sont codés par 4 gènes. Ils sont retrouvés dans la salive de plusieurs arthropodes hématophages (Francischetti *et al.*, 2002b; Valenzuela *et al.*, 2002b; Li *et al.*, 2001a). Leur fonction n'est pas connue, mais il a été montré que certaines protéines de cette famille, chez les lézards, auraient un rôle neurotoxique (Nobile *et al.*, 1996).

c- Des protéines de la superfamille des Salivary Gland (SG) : celle superfamille comprend 10 familles, de SG1 à SG10. Les familles de protéines SG1 à SG7 sont exclusivement retrouvées chez les anophèles. Les SG8 à SG10 peuvent être communs à certains Culicinae (Arca *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2007; Calvo *et al.*, 2009). Les protéines SG1 ont été identifiées pour la 1ère fois chez *An. gambiae* (Arca *et al.*, 1999) d'où le nom de gSG donné aussi aux familles SG. Elles sont codées par 6 gènes et leur fonction reste inconnue. Les protéines gSG2 sont exprimés dans les glandes des adultes mâles et femelles et leur fonction

est inconnue (Arca *et al.*, 1999). Les protéines gSG3 et gSG10 sont des mucines et joueraient un rôle antimicrobien et lubrificateur des pièces buccales des moustiques (Arca *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2009). Les protéines gSG5 sont très fréquentes chez les moustiques même si leur rôle reste à être élucidé (Arca *et al.*, 2005). Celles de la famille gSG6 sont exprimées 16 fois plus dans les glandes des femelles que celles des mâles et joueraient un rôle important dans la prise et la digestion des repas sanguins (Arca *et al.*, 2005; Lanfrancotti *et al.*, 2002). Les protéines gSG7 sont codées par deux gènes (Arca *et al.*, 2005) et joueraient un rôle déterminant dans l'inhibition de la kallikreine et de la production de bradykinine (Isawa *et al.*, 2007).

d- Des mucines diverses qui jouent un rôle dans la lubrification des pièces buccales et du canal salivaire.

e- Des enzymes telles que i) les médiateurs de l'inflammation ou intervenant dans le catabolisme de l'hémostase (5' nucléotidases, apyrases, peroxydases, epoxy hydrolases), ii) enzymes digérant les sucres (amylase et α-glucosidase), iii) des protéases (sérine protéase, metalloprotéases), iiii) de la peroxinectine.

f- Des produits relatifs à l'immunité : des lyzozymes, des lectines.

La **figure 33** représente la répartition des protéines des glandes salivaires d'*An. gambiae* en fonction de leur localisation cellulaire (A) et de leur fonction biologique (B) (Kalume *et al.*, 2005a).

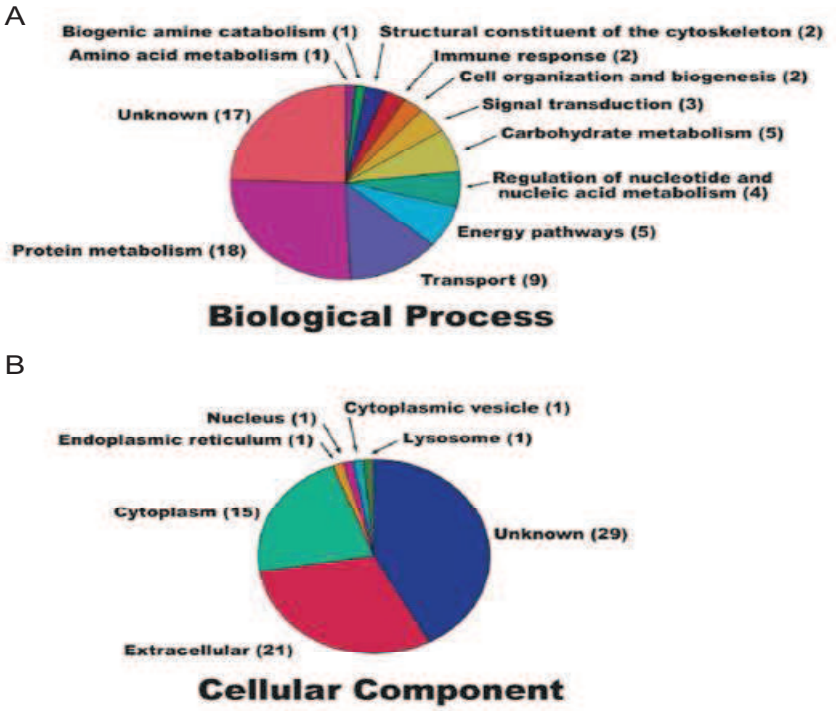


Figure 33 : Répartition des protéines des glandes salivaires d'*An. gambiae* en fonction de leur fonction biologique (A) et de leur localisation cellulaire (B). (Kalume *et al.*, 2005a).

Des différences de composition ont été observées entre les mâles et les femelles (Calvo *et al.*, 2006b). Des protéines sont retrouvées uniquement au niveau des glandes salivaires des femelles (D7, apyrase, anopheline, 5' nucléotidase, gSG7, famille SG1), d'autres au niveau des glandes salivaires des deux sexes mais avec un enrichissement chez les femelles (gSG5, gSG6, gVAG et Ag5).

Une étude complémentaire explorant le sialo-transcriptome d'*An. funestus* décrit plus distinctement la distribution de ces protéines salivaires entre les différentes familles d'insectes (Calvo *et al.*, 2007). Il en ressort que les protéines salivaires ubiquitaires interviennent dans la prise du repas sanguin, on retrouve dans cette classe les enzymes et des membres de la famille de l'AG-5. Le groupe de protéines spécifiques des Diptères inclut les protéines D7 également retrouvées chez les phlébotomes et les culicidés. Les protéines de l'allergène 30kDa et plusieurs mucines ne sont retrouvées que chez les culicidés. Une dizaine de protéines semblent spécifiques des anophèles. Il s'agit majoritairement des protéines de la famille des protéines Salivary Gland, on retrouve les protéines des familles SG1, SG2, SG6 et SG7, le peptide Anopheline et les familles 8.2-kDa et 6.2-kDa.

La différence de composition du sialome des femelles *An. gambiae* en fonction de l'âge des moustiques et en fonction du statut infectieux a été étudiée (Choumet *et al.*, 2007; Marinotti *et al.*, 1996). Le sialome de jeunes anophèles (8 jours) est moins diversifié (29 protéines détectées) que celui des plus âgés (21 jours ; 42 protéines détectées). Parmi les protéines sécrétées, les anophèles âgés présentaient 6 protéines supplémentaires : une protéine D7, gSG5, lysozyme, et les protéines hypothétiques 8.8, 10 et 10.2 kDa (Choumet *et al.*, 2007). De même, chez les phlébotomes, le nombre de protéines salivaires augmente progressivement avec l'âge (Prates *et al.*, 2008).

La différence de composition salivaire a été étudiée entre deux groupes de moustiques, un groupe non infecté et un groupe infecté par *P. berghei* au niveau des glandes salivaires.

Douze protéines ont été retrouvées de manière identique entre les deux groupes de moustiques (Choumet *et al.*, 2007). La protéine gVAG appartenant à la famille de l'antigène 5 est deux fois plus exprimée chez les femelles infectées (Calvo *et al.*, 2006a). Cette protéine aurait un rôle de défense anti-parasite chez le moustique, car l'inhibition de l'expression de ce gène entraîne une augmentation du nombre de plasmodiums au niveau de l'intestin moyen des insectes (Dong *et al.*, 2006). Plusieurs protéines (la gSG6, l'apyrase et deux précurseurs de protéines des D7) ont une expression diminuée au niveau des glandes salivaires chez les anophèles infectés.

III-6-3- Applications post-sialotranscriptomiques possibles

La connaissance du sialotranscriptome des arthropodes vecteurs permet l'identification et la caractérisation biochimique et pharmacologique de molécules (Ribeiro and Francischetti, 2003) affectant l'hémostase, l'inflammation et l'immunité de l'hôte (Ribeiro, 1995). Ceci permet d'identifier de nouvelles protéines candidates pour l'élaboration de vaccins contre la transmission de (de Oliveira *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2009; Ribeiro and Francischetti, 2003; Valenzuela *et al.*, 2002b). La connaissance du sialotranscriptome des arthropodes vecteurs permet aussi de mettre en place des biomarqueurs évaluant l'exposition aux maladies vectorielles (Calvo *et al.*, 2007) ou diagnostiquant les allergies et des protéines utilisables pour les désensibilisations dans un contexte allergique (Ribeiro and Francischetti, 2003).

CHAPITRE IV

ETUDE DE LA RELATION IMMUNOLOGIQUE HOMME-VECTEUR ET APPLICATIONS POTENTIELLES

La pré-exposition de l'hôte vertébré aux piqûres, donc aux antigènes salivaires, des arthropodes peut lui permettre d'empêcher la perte de son sang lors de prises ultérieures de repas sanguin de ces arthropodes ou de contribuer à la mise en place d'un environnement inapproprié à la mise en place et au développement des parasites transmis par ces arthropodes (Andrade *et al.*, 2005). L'étude des protéines salivaires et de leurs effets (immunomodulateurs ou pas) sur la réponse immune de l'hôte vertébré représente donc une nouvelle voie de recherche qui permet de mieux caractériser les mécanismes de transmission des pathogènes et ceux de la relation Homme-Vecteur dans l'optique d'un contrôle plus efficace des maladies à transmission vectorielle. De plus, comme il a été décrit précédemment, certaines de ces protéines salivaires sont immunogéniques et peuvent donc induire chez l'homme une réponse immune spécifique, cellulaire ou humorale. Ceci peut déboucher sur des applications majeures dans 3 domaines : vaccins, allergies et biomarqueurs de l'exposition. L'étude de ces réponses immunes spécifiques aux protéines salivaires pourrait être une voie de développement de nouvelles stratégies vaccinales contre la transmission des pathogènes du vecteur à l'homme ou à l'animal (Sandeman, 1996). De plus, l'évaluation qualitative et quantitative de la réponse Ac spécifique aux extraits ou protéines salivaires pourrait aboutir au développement de nouveaux bio-indicateurs mesurant le niveau d'exposition des individus et des populations humaines aux piqûres des arthropodes vecteurs et évaluant ainsi le risque de transmission des pathogènes (Billingsley *et al.*, 2006; Remoue *et al.*, 2006; Remoue *et al.*, 2005; Schwartz *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1990; Waitayakul *et al.*, 2006). Cette évaluation pourrait aussi permettre de mettre en place des biomarqueurs pouvant estimer le risque d'allergies et/ou de réactions d'hypersensibilité liés à l'influence de protéines salivaires sécrétées au cours de la piqûre (Gillespie *et al.*, 2001; Sandeman, 1996).

IV-1- Salive des arthropodes et vaccins anti-transmission

Comme il a été développé dans le chapitre « **I-3-2-1- Lutte contre le parasite** »**,** la mise au point de vaccins bloquant la transmission des parasites, du vecteur à l'hôte et de l'hôte au vecteur, en stimulant la réponse immune contre le vecteur est une voie alternative très attractive. Des études ciblées sur l'effet des Ac spécifiques à des antigènes (extraits totaux) de l'intestin moyen des moustiques ont rapporté des résultats encourageants. L'étude de la réponse immune induite au site de piqûre par la salive des vecteurs et son effet potentiel sur la transmission et le développement des pathogènes suggèrent aussi qu'il serait possible de contrôler la transmission des parasites par une vaccination de l'hôte avec des composés

salivaires immunogéniques (Titus *et al.*, 2006). Les mécanismes de cette réponse sont à la fois cellulaires et humoraux (Gomes *et al.*, 2002) et pourraient conférer un fort effet protecteur contre la transmission des pathogènes responsables de ces maladies vectorielles, notamment dans les pays endémiques.

IV-1-1- Effet de la pré-exposition aux antigènes salivaires

Les modèles expérimentaux murins représentent un bon outil pour évaluer l'influence d'une pré-exposition aux piqûres, donc à la salive, sur la réponse immune.

La pré-exposition des souris aux antigènes salivaires (injection d'extraits salivaires ou exposition aux piqûres) des phlébotomes induit une augmentation de la production de cytokines de type Th1 tel que l'INF-γ et leurs protége contre l'infection par *L. major* (Belkaid *et al.*, 1998b; Kamhawi *et al.*, 2000; Valenzuela *et al.*, 2001a). Ces observations suggèrent la possibilité intéressante que la vaccination de l'hôte avec des composants salivaires des vecteurs pourrait offrir dans l'inhibition la transmission des leishmanies. De même, la réponse immune induite chez l'hôte par une pré-exposition aux piqûres d'*Ixodes* non infectés permet une résistance et une protection contre la transmission de *Borrelia bugdorferi* (Wikel *et al.*, 1997).

Des lapins ou des cobayes ayant acquis une résistance, suite à des infestations de certaines espèces de tiques, sont moins susceptibles à des maladies transmises par d'autres espèces de tiques (Ferreira *et al.*, 2003). De plus, l'immunisation avec une seule espèce de tiques protège des souris contre la gravité des encéphalites virales transmises par cette même espèces ou par d'autres espèces de tiques (Labuda *et al.*, 2006).

Chez les moustiques, une étude récente a montré que la pré-exposition de souris aux piqûres non infectantes d'*An. stephensi* limitait le développement de *P. yoelii* (réduction des taux de parasites hépatiques et sanguins) injecté lors de piqûres infectantes du même vecteur (Donovan *et al.*, 2007). En effet, ces auteurs ont montré que l'exposition aux piqûres non infectantes (donc, à la salive du moustique seule) entraîne, chez ces souris, une réponse immune Th1 avec augmentation de la production d'IL-12, d'IFN-γ et de NO, provoquant une protection contre l'infection par *P. yoelii*.

La pré-exposition aux antigènes salivaires n'a donc pas les mêmes effets sur la réponse immune de l'hôte que la co-injection de pathogènes et de salive qui exacerbe la pathologie. De plus, l'effet facilitateur de la transmission et du développement de pathogènes causé par une co-injection de pathogènes et de salive peut être complètement annihilé par la pré-exposition de l'hôte aux extraits de glandes salivaires ou aux piqûres non infectantes du vecteur induisant

une forte réaction d'hypersensibilité retardée au site de piqûre (Belkaid *et al.*, 2000; Kamhawi, 2000). Cependant, une récente étude a montré que la pré-exposition de souris aux piqûres d'*Aedes* non infectés exacerbait l'infection par le virus du West Nile. Cette immunomodulation locale induite par l'exposition aux piqûres augmenterait l'inflammation et permettrait ainsi aux virus de se répliquer (Schneider *et al.*, 2007). Cet effet facilitateur est contraire à l'effet protecteur induit par la réaction inflammatoire développée au site de piqûre suite à des expositions répétées aux piqûres de phlébotomes et de tiques (Belkaid *et al.*, 1998b). Ce résultat contradictoire pourrait être expliqué par la nature différente des pathogènes (protozoaires/bactéries versus virus) ou par les différences (quantitatives et/ou fonctionnelles) des protéines salivaires sécrétées lors de la piqûre par des vecteurs différents.

En résumé, ces travaux soulignent que la pré-exposition aux antigènes salivaires induirait un microenvironnement particulier qui serait favorable (exceptionnelement) ou non favorable (généralement) à la transmission des pathogènes par un effet immunomodulateur au niveau du site de piqûre. L'identification des protéines salivaires impliquées dans ce phénomène pourrait permettre de développer des candidats vaccins inhibant l'installation des pathogènes, en créant un micro-environnement défavorable au site de piqûre (de Oliveira *et al.*, 2009; Ribeiro and Francischetti, 2003; Titus *et al.*, 2006).

IV-1-2- Approche vaccinale

Les phénomènes immunologiques liés à cet effet anti-piqûre pourraient impliquer à la fois des mécanismes humoraux ou cellulaires. La neutralisation immunologique d'un ou de plusieurs composés salivaires intervenant dans la modulation, la suppression ou l'inhibition des réponses de l'homme (hémostatique, inflammatoire et immunitaire) ne permettrait plus le succès du repas sanguin et de la piqûre, ce qui pourrait réduire la transmission des pathogènes. Par exemple, au moment de la piqûre, les Ac spécifiques aux antigènes salivaires pourraient inhiber l'activité enzymatique de certaines protéines salivaires et/ou bloquer leur fixation sur les récepteurs spécifiques de cellules de l'hôte afin d'inhiber leur action (Barral *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005). Un autre mécanisme pourrait être la ré-ingestion d'Ac spécifiques aux protéines salivaires des moustiques au moment du repas sanguin. Ces Ac peuvent alors traverser la paroi de l'intestin moyen du moustique (perméabilité), rejoindre les glandes salivaires et bloquer l'invasion des glandes salivaires par les pathogènes (exemple : sporozoïtes de *Plasmodium*) (Brennan *et al.*, 2000). De plus, une forte réponse cellulaire dirigée spécifiquement contre des protéines salivaires pourrait inhiber le bon déroulement de la piqûre en contrecarrant l'effet anti-inflammatoire de certaines protéines salivaires et/ou en

orientant la production de cytokines localement au site de la piqûre (Lima and Titus, 1996; Mbow *et al.*, 1998). Le second mécanisme de protection (mécanisme cellulaire), qui pourrait agir de concert avec le premier (mécanisme humoral), serait indirect, puisque visant le parasite transmis. L'effet immunomodulateur de la salive pourrait également intervenir au moment même de la piqûre infectante en orientant l'immunité locale vers le développement d'une réponse immune protectrice dirigée contre le parasite (exemple *L. longipalpalis*), comme cela a été développé dans le chapitre précédent « **Chapitre III-4-2- Salive des arthropodes, transmission de pathogènes et développement de l'infection** ».

Chez l'animal

La plupart des études visant à développer un vaccin anti-transmission (du vecteur à l'hôte), basé sur l'étude des constituants salivaires d'arthropodes sécrétés au cours de la relation Homme-Vecteur, utilisent des modèles expérimentaux animaux, surtout murins.

Il a été montré que des souris immunisées par des extraits salivaires d'*An. stephensi* développaient des Ac anti-apyrase qui pouvaient inhiber l'activité enzymatique de cette protéine et ainsi favoriser l'agrégation plaquettaire et donc la neutralisation du bon déroulement de la piqûre et du repas sanguin (Mathews *et al.*, 1996). De même, des souris immunisées avec du MAX de *L. longipalpalis*, sous forme recombinante, n'étaient pas affectées par la pathologie de leishmaniose cutanée (due à *L. major*) ou avaient, quand elles étaient atteintes, des lésions plus petites et une charge parasitaire locale plus faible, comparés aux souris n'ayant pas été immunisées (Morris *et al.*, 2001). Cette protection est à la fois de nature humorale, avec la production Ac anti-MAX, et cellulaire, avec la production IFN-γ et de NO (Milleron *et al.*, 2004; Morris *et al.*, 2001). La protéine salivaire MAX, décrite chez *Lu. longipalpis,* peut donc être un candidat vaccin contre la leishmaniose puisque son injection permet non seulement de protéger contre la pathologie, mais aussi d'empêcher le vecteur de prendre un repas sanguin et donc se reproduire (Milleron *et al.*, 2004). Ces effets semblent être spécifiques à *Lu. longipalpis* car les Ac produits chez des souris suite à une vaccination avec le MAX n'avaient pas un effet « neutralisant » sur la prise repas sanguin de *P. papatasi* (Milleron *et al.*, 2004). Il a été aussi montré récemment que, par un mécanisme cellulaire, l'immunisation de cobayes avec la protéine salivaire LlM19 de *Lu. longipalpalis* leurs confèrent une forte protection contre la leishmaniose viscérale (due à *L. infantum*) durant le 5 mois qui ont suivis cette vaccination (Gomes *et al.*, 2008). L'immunisation de souris avec la protéine PpSP15 de la salive de *P. papatasi* leurs confère une protection contre *L. major* (Oliveira *et al.*, 2008), agent de la leishmaniose cutanée très fréquente dans

l'ancienne monde (Afrique, Europe…). Cette protection est comparable à celle induit par le MAX contre la leishmaniose cutanée et pourrait être due à une immunité cellulaire sous l'effet de production de cytokines Th1 et autres composés anti-parasitaires (le NO) et une hypersensibilité retardée (Valenzuela *et al.*, 2001a). Cette dernière serait le résultat des Ac issus de la voie Th1 tels que les IgG2a et de la voie Th2 tels que les IgG1 (Oliveira *et al.*, 2006). Cependant une récente étude a montré que l'immunisation avec d'autres molécules salivaires (PpSP42 et PpSP44) la même famille que le PpSP15 n'induit pas une protection contre l'infection et peut même exacerber cette dernière (Oliveira *et al.*, 2008).

Chez les tiques, une protéine salivaire immunogénique et immunoprotectrice de 15kDa (la 64P) a été décrite chez *R. appendiculatus*. Cette protéine a la particularité de présenter des similarités avec le collagène et la kératine de l'épiderme des mammifères (Trimnell *et al.*, 2002). La vaccination de cobayes avec cette protéine induit une réponse cellulaire et humorale. De plus, les Ac contenus dans leur sérum (prélevé après cette immunisation) réagit avec les extraits de glandes salivaires d'autres espèces de tiques (Trimnell *et al.*, 2005), suggérant ainsi la pertinence de cette protéine comme candidat vaccin anti-tique. Dans un modèle murin, l'immunisation avec cette protéine a montré une réduction de la transmission de virus d'encéphalites et une meilleure survie des souris (Labuda *et al.*, 2006). Une séquence correspondante à cette protéine est retrouvée chez plusieurs autres espèces de tiques (Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007; Bergman *et al.*, 2000; Couvreur *et al.*, 2008; Daix *et al.*, 2007). Ceci explique la résistance que confère l'immunisation avec cette protéine vis-à-vis des piqûres et de la transmission de pathogènes par des tiques autres que *R. appendiculatus* (Labuda *et al.*, 2006). Cette protéine interagirait avec des protéines du derme et de l'épiderme de la peau de l'hôte vertébré au moment de la piqûre, ce qui entraîne une réaction immunitaire spécifique et non spécifique (y compris la réaction inflammatoire). Cette dernière va altérer localement le micrœnvironnement du site de piqûre et perturber la prise de sang de la tique qui ne pourra donc plus transmettre les pathogènes (Havlikova *et al.*, 2009).

Vers un vaccin pour l'homme ?

Bien que tous les vecteurs, par leur mode de piqûre et les pathogènes qu'ils transmettent, ne peuvent pas être strictement comparables à ceux de la leishmaniose ou aux tiques, les travaux et les observations faits sur le système phlébotome/leishmanies ou tiques/pathogènes suggèrent néanmoins que l'élaboration d'un vaccin utilisant des protéines salivaires constitue une approche rationnelle dans l'objectif de réduire la transmission des maladies vectorielles.

L'avantage premier d'utiliser une protéine salivaire comme cible vaccinale dans le cadre d'un vaccin bloquant la transmission de pathogènes est que les populations vivant en zone d'endémie sont exposées aux piqûres des vecteurs (non infectante à grande majorité) pendant toute la saison d'exposition, qu'elle soit saisonnière ou pérenne. Il a été montré que les populations vivant en régions endémiques, et plus particulièrement les adultes, développent une immunité contre l'infection et le développement de la leishmaniose cutanée (Davies and Mazloumi Gavgani, 1999). Cette différence est tout naturellement attribuée à l'acquisition progressive d'une immunité protectrice par des stimulations antigéniques parasitaires et à l'exposition répétée aux vecteurs infectés (Struik and Riley, 2004), comme dans le cadre du paludisme. Mais les travaux de Davies et Malloumi Gavgani (Davies and Mazloumi Gavgani, 1999) ont aussi rapporté que ces individus ne possédaient pas d'Ac anti-*Leishmania* et étaient négatifs au test d'hypersensibilité retardée suggérant l'implication d'un facteur autre que l'immunité de prémunition dans cette réponse protectrice. De plus, d'autres travaux ont montré que des enfants, vivant en zone d'endémie, pré-exposés aux piqûres non infectantes de phlébotomes, développaient une immunité Th1 protectrice contre l'infection et le développement des leishmanies lors de piqûres infectantes ultérieures, comparés à ceux n'ayant pas été pré-exposés (Gomes *et al.*, 2002). Ce « boost immunitaire » naturel par la piqûre non infectante favoriserait ainsi l'établissement d'une réponse protectrice robuste et durable contre le pathogène. La reproduction et le maintien d'une telle immunité par une immunisation par des composés salivaires pourraient participer à diminuer la morbidité de cette parasitose, et aux maladies à transmission vectorielle en générale.

Chez les moustiques, il n'existe presque pas de travaux sur l'identification et la caractérisation de candidats vaccins anti-transmission basés sur l'étude immunologique des protéines salivaires. Cependant, chez les anophèles, deux protéines de 29 et 100 kDa ont été identifiées et caractérisées, en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre la salive de la femelle d'*An. gambiae* (Brennan *et al.*, 2000). Ces protéines seraient des récepteurs des glandes salivaires qui se lient spécifiquement aux sporozoïtes au moment de l'invasion des glandes salivaires par ces derniers. Les anticorps produits par l'immunisation de souris avec ces protéines peuvent entraîner un blocage de 75% de l'invasion des glandes salivaires d'*An. stephensi* par des sporozoïtes de *P. yoelii* (Brennan *et al.*, 2000). Cependant, le développement de ce type de vaccins s'avère compliqué puisque les Ac produits, chez l'hôte vertébré, par l'immunisation avec des protéines salivaires, doivent être ingérés par le moustique lors d'une piqûre, traverser le tube et les enzymes digestifs de ce dernier, migrer vers ses glandes salivaires, avant de pouvoir bloquer leur invasion par les sporozoïtes.

En résumé, de tels vaccins basés sur des protéines salivaires pourraient être administrés chez les jeunes enfants qui n'ont pas encore développé d'immunité anti-salive des vecteurs dans des contextes naturels. Ils pourraient également être appliqués aux voyageurs. Mais on a remarqué un polymorphisme dans les séquences de certaines protéines salivaires chez des mêmes espèces d'insectes provenant de régions géographiques différentes; cela a été mis en évidence pour le MAX (Milleron *et al.*, 2004a; Warburg *et al.*, 1994). Ceci peut poser des difficultés dans l'élaboration du vaccin car il est probable que les hommes ne répondent pas de la même manière en fonction de ces antigènes salivaires. Un vaccin ciblant une protéine ubiquitaire et dont la séquence est relativement bien conservée entre les différentes espèces ou genres d'arthropodes vecteurs ou l'utilisation de plusieurs protéines salivaires candidates permettrait de développer des vaccins probablement plus efficaces.

L'identification de protéines salivaires immunogéniques chez d'autres vecteurs que ceux présentés dans ce chapitre pourraient permettre le développement de stratégies similaires pour d'autres maladies à transmission vectorielle.

IV-2- Salive des arthropodes et réaction allergiques chez l'hôte

Depuis les années 1990, les principaux travaux sur le rôle immunologique de la salive des moustiques concernaient les réactions allergiques et d'hypersensibilités liées à l'effet immunologique des protéines salivaires sécrétées pendant la piqûre. Ces études, principalement menées au Canada et en Finlande, ont porté notamment sur l'hypersensibilité des individus aux piqûres de moustiques *Aedes* et *Culex*. Le but majeur de ces études est d'identifier et de caractériser les protéines salivaires impliquées dans ces phénomènes afin d'améliorer le diagnostic de risque d'allergies et de développer des immunothérapies (par désensibilisation par exemple) pour les patients exposés (Peng and Simons, 2007). Les mécanismes immunologiques mis en jeu dans la pathogenèse des réactions allergiques sont liés à des Ac spécifiques de type IgG et IgE (associés aussi bien aux réactions d'hypersensibilité (RH) immédiate qu'aux RH retardée) et aux lymphocytes (associés qu'aux réactions d'hypersensibilité retardée) (Peng and Simons, 2004). Les protéines immunogéniques majeures impliquées dans ces phénomènes ont été caractérisées et sont majoritairement reconnues par les isotypes IgG1, IgG4 et IgE (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997b; Peng *et al.*, 1995). Les taux d'IgG4 et IgE anti-protéines salivaires d'*Aedes aegypti,* de *Culex et* d'*Anopheles* serait également un indicateur d'exposition intense à la piqûre de ce vecteur (Palosuo *et al.*, 1997; Reunala *et al.*, 1994). Une récente étude immuno-

épidémiologique au Sénégal a montré que ces réponses IgE et IgG4 spécifiques aux extraits salivaires totaux augmentaient au cours de la saison d'exposition chez des enfants exposés aux piqûres d'*Aedes* (Remoue *et al.*, 2007). Certaines de ces protéines sont communes aux différentes espèces de moustiques alors que d'autres sont spécifiques à une espèce (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997a). Ces protéines peuvent être ainsi utilisées, sous forme recombinante, en diagnostic comme des biomarqueurs évaluant l'exposition aux piqûres allergisantes ou en immunothérapie permettant une désensibilisation de l'homme (Peng and Simons, 2007; Remoue *et al.*, 2005).

Ces travaux sont les premiers à souligner la spécificité de certaines protéines salivaires à une espèce (*Ae. aegypti* versus *Ae. vexans* par exemple) mais aussi certains antigènes spécifiques du genre de moustique (*Aedes, Culex*, *Anopheles*…) ou communs aux différents genres.

IV-3- Salive et marqueurs d'exposition aux piqûres des arthropodes vecteurs

L'étude des relations immunologiques Homme-Vecteur par l'analyse quantitative et qualitative de la réponse Ac spécifique aux protéines salivaires peut également permettre d'identifier des marqueurs immuno-épidémiologiques évaluant le niveau d'exposition des individus et des populations aux piqûres des vecteurs et de ce fait au risque de transmission des maladies. Le développement d'une réponse immunitaire de type humorale en réponse aux stimulations des protéines salivaires antigéniques induit la synthèse d'Ac spécifiques chez l'hôte vertébré. La mise au point de ce type de biomarqueurs ou indicateurs peut constituer une alternative complémentaire aux méthodes entomologiques et parasitologiques qui sont les méthodes actuelles de référence pour l'évaluation de l'exposition aux vecteurs et de la transmission des pathogènes.

Chez l'homme, une réponse Ac spécifiques aux protéines salivaires peut être détectée chez les individus exposés aux vecteurs. Le premier exemple d'un tel indicateur immuno-épidémiologique a été montré chez des individus infectés par *Borrelia burgdorferi*, le pathogène responsable de la maladie de Lyme. En effet, le taux d'Ac IgG spécifiques à la salive d'*Ixodes* était corrélé avec celui des Ac anti-bactérie et était supérieur chez des individus infectés par *B. burgdorferi*; des individus exposés à la piqûre de tiques dures présentaient un taux d'Ac anti-salive de ces tiques plus élevé que des individus non exposés (Lane *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 1991; Schwartz *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1990). Ceci

suggérerait que l'évaluation de la réponse Ac anti-salive pourrait permettre d'étudier l'émergence de l'infection et de prédire le risque de transmission. Plus récemment, des travaux dans d'autres sites sur *Ixodes scarpularis* (Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007) ont permis de confirmer la pertinence de l'utilisation du taux d'Ac IgG anti-protéines salivaires spécifiques pour évaluer le niveau d'exposition à ces vecteurs. Il a été aussi montré que les Ac dirigés contre les extraits salivaires de phlébotomes semblent être un biomarqueur d'exposition aux leishmanioses (Mbow *et al.*, 1998). De plus, un tel biomarqueur pourrait donner des indication sur les expositions récentes ou le changement de niveau d'exposition aux piqûres des phlébotomes (Clements *et al.*, 2010). Des études récentes ont montré que deux protéines recombinantes de la salive de *Lu. longipalpalis*, la LJM17 et la LJM11, peuvaient être des biomarqueurs de l'exposition à la piqûre de ce vecteur et donc prédictifs du risque de leishmaniose viscérale chez l'homme et le chien (Souza *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2010).

Des isotypes IgG1 et IgG4 spécifiques à la salive de réduves triatomidés, vecteurs de la maladie de Chagas, ont été détectés chez des individus exposés ou atteints de la maladie de Chagas (Nascimento *et al.*, 2001). Récemment, les réponses IgG spécifiques à 2 protéines de 14 et 21 kDa de la salive de *T. infestans* ont été décrites comme potentiels biomarqueurs d'exposition et pourraient servir au diagnostic précoce de nouvelles piqûres et à la surveillance de la recolonisation des milieux par des populations nouvelles de triatomes (Schwarz *et al.*, 2009).

Cette approche a été également démontrée pour l'évaluation de l'exposition aux piqûres des glossines (mouche tsé-tsé), vecteurs de la Trypanosomiase Humaine Africaine (THA). En effet, des Ac. IgG spécifiques à la salive de glossines ont été détectés chez des lapins (Ellis *et al.*, 1986) et des humains (Poinsignon *et al.*, 2007) exposés aux piqûres de ces vecteurs. Ainsi, l'évaluation de la réponse Ac spécifique à la salive de glossines chez ces individus exposés pourrait s'avérer comme indicateur d'exposition aux piqûres de glossines. A cet effet, une protéine immunogénique de 54 kDa a été décrite. Cette protéine serait spécifique à l'espèce *Glossina fuscipes fuscipes,* principale espèce vectrice de *Trypanosoma brucei gambiense* (Poinsignon *et al.*, 2007). En plus, 3 autres protéines salivaires *de G. fuscipes fuscipes* (37, 60 et 150 kDa) ont été retrouvées immunogéniques chez la majorité des individus exposés, infectés ou non. Ces protéines salivaires semblaient être communes à d'autres espèces de glossines et pourraient ainsi être de possibles candidats pour l'élaboration d'un marqueur immuno-épidémiologique appréciant l'exposition aux espèces des glossines (Poinsignon *et al.*, 2008b) D'autres travaux ont permis d'identifier les protéines immunogéniques Tsal-1 et -

2 comme des candidats potentiels biomarqueurs d'exposition (Caljon *et al.*, 2006). La salive de *G. morsitans morsitans* semble induire une forte réponse humorale (IgG1 et IgE) contre ces deux protéines dans des modèles murins mais également chez des individus exposés (infectés ou non) naturellement aux piqûres de ces insectes.

Plusieurs études ont prouvé que la salive des moustiques était antigénique. Les premières études sur la salive de moustique ont été réalisées dans le domaine de l'allergologie. Par exemple, le taux d'IgG4 et IgE anti-protéines salivaires d'*Aedes aegypti,* de *Culex et* d'*Anopheles* serait également un indicateur d'exposition intense à la piqûre de ce vecteur (Palosuo *et al.*, 1997; Reunala *et al.*, 1994). D'autres études ont montrés que certaines de ces protéines, majoritairement reconnues par des IgG4 et IgE, seraient spécifiques à une espèce ou un genre alors que d'autres semblent communes à ces différents genres ou espèces de moustiques (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997a; Jeon *et al.*, 2001). Une récente étude immuno- épidémiologique au Sénégal a montré que ces réponses IgE et IgG4 spécifiques à la salive augmentaient au cours de la saison d'exposition chez des enfants exposés aux piqûres d'*Aedes aegypti* (Remoue *et al.*, 2007). De plus, cette réponse Ac était différente selon les individus et le village où ils habitaient. Ce biomarqueur semble donc apprécier également l'hétérogénéité d'exposition en fonction des individus et des villages (Remoue *et al.*, 2007). Des anticorps IgG et IgE de la salive de *Culex quinquefasciatus* ont été détectés chez des individus vivant dans des régions tropicales endémiques pour *Wucheria bancrofti* (Das *et al.*, 1991).

Contrairement aux données concernant les piqûres d'*Aedes* et *Culex* déclenchant pour la plupart des réactions allergiques, peu d'études sur la réponse Ac anti-salive ont été décrites chez les anophèles. Récemment, des travaux ont montré que des enfants vivant en zone d'endémie palustre, au Sénégal, développaient une réponse IgG spécifique aux antigènes salivaires totaux d'*An. gambiae* qui était associée positivement au degré d'exposition des enfants aux piqûres de ce vecteur, mesurée par des méthodes entomologiques classiques (Remoue *et al.*, 2006). Cette réponse IgG semblait transitoire, une diminution du niveau des IgG a été observée entre septembre et décembre en absence d'une forte exposition aux piqûres d'*Anopheles* contrairement aux villages fortement exposés où le niveau de la réponse IgG a été maintenu durant la période (Remoue *et al.*, 2006). De plus, cette réponse Ac spécifique serait prédictive d'une morbidité palustre. En effet, en septembre, les enfants développant un accès palustre dans les trois mois suivants, présentaient une réponse IgG supérieure aux enfants qui n'allaient pas faire d'accès palustre (Remoue *et al.*, 2006). Il a également été observé que des patients infectés par *P. falciparum* ou *P. viva* présentaient un plus fort taux

d'IgG anti-salive d'*An. dirus* (Waitayakul *et al.*, 2006) et *d'An. darlingi* (Andrade *et al.*, 2009) que des individus non infectés ou vivant hors zone d'endémie. Une autre étude a montré que la réponse anticorps IgG spécifique à la salive d'*An. gambiae* peut également être utile dans l'évaluation de l'exposition de voyageurs (militaires français en mission en Côte d'Ivoire et au Gabon) puisque les Ac spécifique aux piqûres d'*An. gambiae* diminuaient dans les 3 mois suivant l'arrêt de l'exposition. (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007). La réponse Ac IgG spécifique de la salive d'*Anopheles* pourrait ainsi représenter un marqueur immunologique d'exposition aux piqûres de ces vecteurs et de ce fait au risque de transmission des *Plasmodium.*

On remarquait, dans l'étude au Sénégal, une grande hétérogénéité inter-individus dans le niveau de réponse des Ac anti-salive ; hétérogénéité que des facteurs épidémiologiques inter-humains (génétique, co-infection par des pathogènes) et des différences de niveau d'exposition au sein des mêmes villages pourraient expliquer. Dans cette même zone, les antigènes de la salive d'*An. gambiae* ont été identifiés par une technique d'immuno-empreinte : 4 protéines salivaires ont majoritairement été reconnues par le sérum de ces individus (175, 115, 72 et 30 kDa). Mais, les différences inter-individus observées dans l'intensité et le nombre de protéines immunogéniques reconnues ont souligné l'hétérogénéité de ces réponses (Cornelie *et al.,* 2007). Néanmoins, deux protéines (175 et 72 kDa) ont été retrouvées immunogéniques chez tous les individus. Ces travaux de Cornelie *et al.* (Cornelie *et al.*, 2007) démontre la nécessité d'identifier des protéines spécifiques, pouvant être communément reconnues par les Ac du sérum de tous les individus exposés au piqûre d'*Anopheles*. C'est dans ce cadre que la protéine gSG6 (13 kDa) a été identifiée, grâce aux techniques de sialotranscriptomique et de protéomique, dans la salive secrétée d'*An. gambiae* lors de la piqûre (voir « **chapitre III-6-2- Description du sialome d'*Anopheles* »**). Elle jouerait un rôle dans le repas sanguin du moustique (Arca *et al.*, 2005; Calvo *et al.*, 2006a) et est également retrouvée au niveau des glandes salivaires d'*An. stephensi* et *An. funestus* mais non chez *An. darlingi* (Calvo *et al.*, 2007). L'antigénicité de recombinantes de cette protéine a été confirmée chez des individus faiblement exposés (militaires en mission en Afrique) aux piqûres d'*Anopheles* (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007) et chez des enfants sénégalais exposés aux piqûres d'*An. gambiae* (Poinsignon *et al.*, 2008a).

Mais face aux problèmes de rendement dans la production de ces protéines recombinantes, une stratégie peptide a été développée en combinant des analyses bio-informatiques et immuno-épidémiologiques (Poinsignon *et al.*, 2008a). Cette stratégie a permis d'aboutir à l'identification de 5 peptides (gSG6-P1 à gSG6-P5) antigéniques. Ces

peptides ont été par la suite synthétisés et leur immunogénicité testée : deux d'entre eux étaient plus immunogéniques (gSG6-P1 et gSG6-P2). Cependant, le gSG6-P1 semblait être le plus pertinent comme candidat marqueur d'exposition (Poinsignon *et al.*, 2008a). En effet, une augmentation significative de la réponse IgG au cours de la saison d'exposition et une association positive entre IgG et le niveau d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* a été trouvée significative seulement pour le peptide gSG6-P1. Cette approche suggérait que seule la réponse IgG spécifique de gSG6-P1 pouvait être un biomarqueur permettant l'évaluation spécifique de l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*. Ce peptide a été validé comme biomarqueur en contexte de très faible exposition (Poinsignon *et al.*, 2009). En effet, les enfants résidant en zone d'endémie palustre dans des villages présentant de très faibles densités anophéliennes développaient une réponse IgG spécifique de gSG6-P1 et cette réponse spécifique augmentait significativement au cours de la saison d'exposition à *Anopheles*. Cette étude suggère que la réponse IgG spécifique du peptide gSG6-P1 pourrait être un marqueur de faible exposition. C'est principalement dans ces contextes de faible densité de vecteurs (altitude, milieu urbain, saison sèche) que les méthodes entomologiques de référence présentent des limites de sensibilité (Poinsignon *et al.*, 2009). De plus, cette étude a montré que le peptide gSG6-P1 permettait d'évaluer l'hétérogénéité inter-individus même en cas de contexte de très faible exposition.

Les méthodes entomologiques ne sont pas conçues pour estimer le niveau individuel d'exposition aux vecteurs du paludisme et elles ne sont pas toujours utilisables, en particulier chez les principales victimes du paludisme (enfants, femmes enceintes et voyageurs en zone d'endémie) ou pour évaluer les méthodes de protection individuelle contre les moustiques (voir **Chapitre II**). La sérologie contre les plasmodiums permet d'estimer le contact Homme-Parasite mais pas directement le contact Homme-Vecteur. Elle est donc soumise aux biais introduits par les mesures de lutte antiplasmodiale (voir **Chapitre II**). L'analyse des réponses immunes contre des antigènes de la salive d'*Anopheles*, sous forme native, recombinante ou synthétique, pourrait donc être utilisée pour évaluer l'intensité de l'exposition aux vecteurs de paludisme et l'efficacité de la lutte anti-vectorielle, indépendamment de la transmission des plasmodiums.

TROISIEME PARTIE

TRAVAUX DE THESE PROPREMENT DITS

CHAPITRE V

OBJECTIFS

V-1- Objectif général

L'objectif principal de cette thèse était d'évaluer si la réponse Ac (IgG majoritairement) spécifique à des protéines salivaires d'*Anopheles* pouvait représenter un biomarqueur évaluant l'exposition des populations humaines aux piqûres de ces vecteurs du paludisme et de valider, plus particulièrement, cette réponse Ac spécifique comme un nouveau critère d'efficacité des stratégies de lutte contre ces vecteurs.

La réponse Ac a été évaluée vis-à-vis de la salive totale d'*An. gambiae* et d'un peptide (gSG6-P1) issu de la protéine gSG6 spécifique aux moustiques *Anopheles*.

V-2- Objectifs spécifiques

L'objectif général de cette thèse s'était décliné en différents objectifs spécifiques regroupés en 2 grandes parties, mais correspondant à des études menées dans différents contextes épidémiologiques (en Angola, au Sénégal et au Bénin).

V-2-1- Evaluation de l'exposition et de l'efficacité de la LAV dans des contextes épidémiologiques différents

Les objectifs spécifiques de cette partie étaient de :

Valider le concept « réponse anticorps anti-salive totale d'anophèles » comme marqueur d'exposition permettant d'évaluer l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticides (MIIs), en particulier, et de la lutte anti-vectorielle (LAV), en général, même en zone de faible exposition à *An. gambiae* (**étude LAV/Angola**).

Evaluer la réponse Ac spécifique à un peptide (gSG1-P1) de la protéine gSG6 et sa pertinence comme indicateur ou outil (complémentaire aux méthodes entomologiques et parasitologiques de référence) mesurant mieux l'efficacité réelle des MIIs, en particulier, et de la LAV, en général, dans cette zone de faible exposition (**étude LAV/Angola**).

Evaluer, par la quantification des Ac spécifiques au peptide gSG6-P1, l'hétérogénéité de l'exposition et du risque de paludisme et valider, par l'analyse de questionnaires épidémiologiques, l'efficacité de l'utilisation de différentes stratégies de lutte contre les moustiques (moustiquaires, bombes aérosols, serpentins fumigènes, répulsifs,…) par les populations vivant en milieu urbain africain (Région de Dakar, où *An. gambiae s.l.* assure principalement la faible transmission du paludisme) (**étude Actu-Palu 2008/Sénégal**).

V-2-2- Optimisation du peptide gSG6-P1 comme biomarqueur salivaire

Cette partie avait pour objectifs spécifiques de :

Evaluer avec les Ac spécifiques peptide gSG6-P1 l'exposition aux piqûres d'*Anopheles funestus* et valider ce peptide comme un indicateur/outil d'efficacité de la LAV dans une zone de méso-endémicité palustre où *An. funestus* est le vecteur de paludisme (**étude Pal-Fleuve/Sénégal**).

Etudier l'acquisition de la réponse Ac anti-gSG6-P1 et valider ce peptide comme bio-marqueur d'exposition chez les très jeunes enfants (0-12 mois, souvent faiblement exposés) vivant en zone d'hyper-endémie palustre (**étude Tori-Bossito/Bénin**) où la transmission est assurée par des vecteurs (complexe *An. gambiae* et *An. funestus* notamment) résistants aux insecticides.

CHAPITRE VI

METHODES

Ce projet de thèse a été mené, en complémentarité, dans 4 différentes zones de 3 pays différents pays (Angola, Sénégal et Bénin), en concordance avec les objectifs spécifiques fixés.

i) **En Angola** : dans la zone de Lobito, ville côtière de l'Ouest du pays où la transmission du paludisme se fait de manière hypo-endémique (faible endémicité palustre). Cette transmission est saisonnière longue de 7-12 mois (voire pérenne). *An. gambiae s.s.* (*sensu stricto*) constitue le principal vecteur dans la zone.

ii) **Au Sénégal :** dans la région de Dakar, capitale du Sénégal, caractérisée par une urbanisation rapide se faisant de manière très différente selon les quartiers, les zones ou communes urbaines. Dans cette région de faible endémicité palustre, la transmission de *Plasmodium* est saisonnière et courte de 3-4 mois. *An. arenbiensis* (membre du complexe d'espèces *An. gambiae*) est le principal vecteur du paludisme humain.

iii) **Au Sénégal :** dans la zone de la basse vallée du fleuve Sénégal, village de Gankett Balla, où *An. funestus* est l'unique vecteur et le principal vecteur du paludisme chez l'Homme. C'est une zone d'endémicité palustre moyenne où la transmission est saisonnière et courte de 3-5 mois.

iv) **Au Bénin :** dans la commune de Tori-Bossito, zone de forte endémicité palustre avec un degré élevé de résistance des vecteurs aux insecticides et où la transmission, pérenne toute l'année, est assurée par diverses espèces d'anophèles, notamment celles du complexe *An. gambiae* et *An. funestus.*

Cependant, les approches méthodologiques utilisées dans ces différentes zones d'étude sont presque les mêmes sauf à Gankette Balla. Il s'agit, sur le terrain et au laboratoire, d'études multidisciplinaires incluant des enquêtes épidémiologiques, entomologiques (des captures de moustiques), parasitologiques (gouttes épaisses de sang sur lame pour la détection *P. falciparum*) et immunologiques (prélèvements de gouttes de sang sur papier buvard pour le dosage des Ac anti-protéines salivaires). Cependant, à Gankette Balla, ce sont des sérums issus de prélèvements de sang veineux qui ont servi d'échantillons pour nos analyses immunologiques (dosages d'Ac anti-protéines salivaires).

VI-1- Etude « LAV-Angola »

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'une collaboration entre le service médical de la SONAMET-Angola (Société Nationale de Métallurgie), compagnie basée à Lobito (Angola) et spécialisée dans la fabrication d'équipements pour les installations de diverses compagnies

pétrolières, avec l'unité Malaria Control Program (MCP) coordonnée par les Drs Patrick Besnard et Jacques Lemire pour la partie « terrain », l'IRD (Institut de Recherche pour le Développement) avec l'UR-016 (Dr. P. Carnevale et Dr. F. Remoue) et l'Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale (OCEAC) de Yaoundé (Cameroun) avec J-C Toto et V. Foumane (Laboratoire de Recherche sur le Paludisme) pour les parties entomologique et parasitologique. Elle a été menée dans la localité de Lobito en Angola de mars 2005 à janvier 2007.

VI-1-1- Zone d'étude

L'Angola possède des caractéristiques climatiques qui varient d'une province à une autre. Mais de façon générale 4 types climatiques y sont représentés : le type équatorial de l'extrême Nord (plus proche de l'équateur), le type tropical plus répandu à travers le pays (notamment au Centre-Ouest et à l'Est) et le type méditerranéen voire sahélo-désertique au Sud. Le cadre végétatif connaît aussi la même évolution avec un paysage de forêts et savanes humides au Nord et Nord-Est, savanes tropicales au Centre-Ouest et Centre-Est, savanes sèches et steppes au Sud. Les moyennes annuelles des températures, des précipitations et de l'hygrométrie varient respectivement de 21°C à 26°C, de 100 à 1600mm et de 50 à 100% suivant les régions.

La situation du paludisme dans le pays est très diversifiée avec différents niveaux d'endémicité et un potentiel d'épidémies dans 5 provinces du pays (provinces de Lubango, Kunene, Kuanda, Kubando et Namibe). Mais de façon globale, toute la population angolaise est exposée au paludisme avec 92% de risques endémiques et 8% de risques épidémiques (Fortes, 2000a). Le paludisme y est de loin la plus grande cause de morbidité (il représente 60% de la demande de soins de santé) et la principale cause de mortalité pour toutes les tranches d'âge, en particulier pour les enfants de moins de 5 ans (Fortes, 2000b). Environs 22% des décès hospitaliers sont attribuables à cette parasitose (Cuamba *et al.*, 2006). Il impose de ce fait un lourd fardeau économique à la population angolaise, car étant à l'origine de pertes estimées à plus de 28 journées/an de travail pour la population active (Fortes, 2000b).

An. gambiae s.s. constitue le principal vecteur du paludisme dans ce pays avec ses 2 formes moléculaires M (« Mopti ») et S (« Savannah »), mais la présence de vecteurs tels qu'*An. funestus*, *An. arabiensis*, *An. melas* a été signalée (Cuamba *et al.*, 2006). A l'instar de la plupart des pays de l'Afrique sub-saharienne, *P. falciparum* y est l'espèce plasmodiale la

plus fréquente. L'épidémiologie du paludisme permet de diviser schématiquement l'Angola en 3 zones correspondant chacun à un faciès différent (**Figure 34**) :

- zone I : faciès équatorial
- zone II : faciès tropical (qui renferme la ville portuaire de Lobito, lieu de notre étude)
- zone III : faciès sahélien

Figure 34 : Faciès épidémiologiques du paludisme en Angola selon la classification de J. Mouchet et Coll. 1994

La localité de Lobito

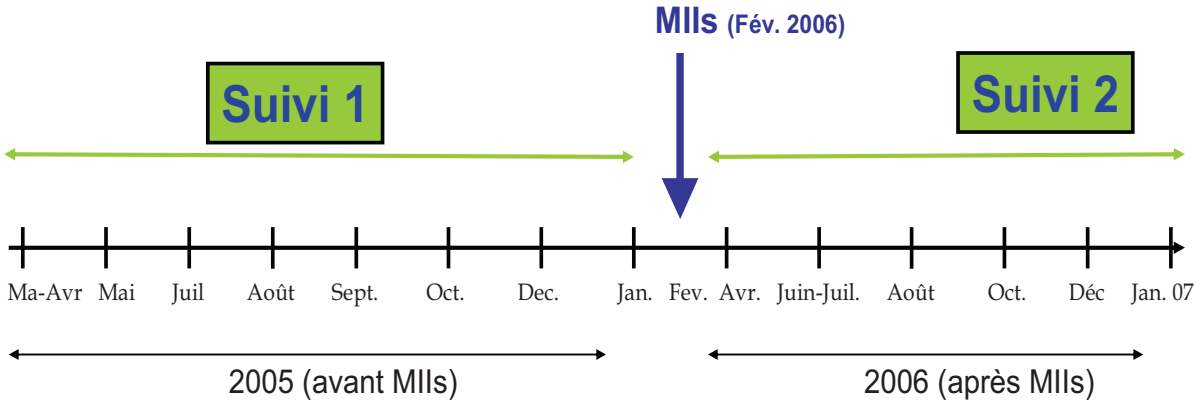
La zone II (**Figure 35**) qui occupe le Nord-Ouest du pays est constituée des provinces de Zaire, Kuanza, Sul, Luanda, Bengo, Huambo, Bié et **Benguela**. Cette dernière province renferme la ville de **Lobito**, ville portuaire de l'Angola distante de 30 km de la ville de Benguala qui est le chef-lieu de la province du même nom. Lobito bénéficie d'un climat assez typique puisqu'étant une zone intermédiaire entre le régime équatorial de l'extrême nord de l'Angola et le climat de type méditerranéen du sud. La région de Lobito subit une saison pluvieuse d'octobre à mai puis une saison sèche de juin à septembre entrecoupée de rares périodes orageuses (notamment en octobre). La pluviométrie annuelle varie de 200 à 700 mm. Les températures sont maximales de décembre à avril (min. 25°-max 36°C), pour décroître jusqu'aux "frimas" de l'hiver austral (min. 17°-max. 28°c) en juillet-août, les moyennes

annuelles étant comprises entre 21°C et 26°C. L'hygrométrie moyenne est de 80% et le paysage de type savane.

La transmission du paludisme y est faible, saisonnière et longue (faciès tropical (II) de la classification de Mouchet et Coll., 1994) de 7 à 12 mois avec cependant un pic de mars à mai. Les vecteurs du paludisme dans cette région sont *An. gambiae s.s.* (avec ses 2 formes S et M), principalement, et *An. arabiensis* et *An. melas* (espèces du complexe *An. gambiae* aussi) qui jouent un rôle secondaire, mais parfois localement important, dans la la transmission de *P. falciparum* (Cuamba *et al.*, 2006), l'espèce plasmodiale majoritairement diagnostiquée dans la région. Ces vecteurs sont caractérisés par une capacité vectorielle extrêmement élevée et par un développement préférentiel dans un paysage de savanes humides et moins humides.

VI-1-2- Population étudiée

Notre population d'étude était constituée de familles d'ouvriers travaillant pour la SONAMET, chantier parapétrolier avec 1000 employés, nationaux et expatriés, en moyenne. Elle regroupait 21 familles de travailleurs qui habitaient le même quartier de Bella Vista et étaient donc susceptibles d'être exposées de manière similaire aux piqûres anophéliennes. Ces familles ont été sélectionnées à partir du registre 2004 des cas de paludisme confirmés par le service médical de la SONAMET. Au total 230 individus de ces 21 familles, adultes et enfants, de sexes masculin et féminin, ont été inclus dans un suivi longitudinal d'environ 2 ans, de mars 2005 à janvier 2007. Ce suivi a été mené en deux temps (**Figure 35**) : avant et après la distribution, en février 2006, de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MIIs) de longue durée (4 ans selon le fabricant) ou « Long-Lasting Insecticide Nets (LLINs) » (moustiquaires Permanet®) à tous les individus des ménages des différentes familles.



Passages chaque 6 semaines : entomologie + parasitologie + prélèvement sang (buvard)

Figure 35 : Diagramme de suivis de l'étude LAV/Angola

Le nombre d'individus au sein d'une famille variait de 2 à 23 et le nombre de MIIs distribuées à chaque famille dépendait de la taille (nombre d'individus), du nombre de chambres et de lits dans la famille considérée. Cette étude comparative s'est faite sur la base de l'ensemble des données immunologiques (réponse anti-salive et protéines salivaires d'*An. gambiae*), épidémiologiques, parasitologiques et entomologiques recueillies sur le terrain grâce à une série d'enquêtes effectuées toutes les 6 semaines par l'équipe MCP de la clinique SONAMET de Lobito (**Figure 35**).

VI-1-2- 1- Enquêtes sur l'utilisation et l'entretien des MIIs

Deux séries d'enquêtes sur l'utilisation et l'entretien des moustiquaires Permanet® ont été menées en avril et juin-juillet 2006, donc 2 et 4-5 mois, respectivement, après la mise en place des MIIs (février 2006). Au cours de ces enquêtes, une série de questionnaires-réponses a été posée aux membres adultes des familles (parents ou tuteurs pour enfants), ce qui permettait de suivre l'évolution de l'utilisation et de la qualité des moustiquaires ainsi que le comportement de leurs utilisateurs en termes d'entretien. Ainsi, l'état des moustiquaires a été classé en 7 catégories : « A » = bon état et installée; « B » = bon état mais non installée au moment de l'enquête; « C » = avec des trous, installée; « D » = avec des trous, non installée au moment de l'enquête; « E » = abîmée, installée; « F » = abîmée, non installée, « G » = cas d'un changement de moustiquaire a été effectué.

VI-1-2- 2- Enquêtes et recueil de données entomologiques

Des pièges lumineux de type « CDC Miniature Light Trap » ont été, chaque 3 semaines, installés dans 6 maisons-témoins et permettaient de suivre l'évolution relative des densités de moustiques. Deux pièges étaient placés de 19h à 7h dans chaque maison-témoin pendant 2 jours successifs, à des endroits susceptibles d'avoir des moustiques et choisis par des entomologistes expérimentés. Ainsi, 33 séances de captures de nuit ont été organisées, faisant au total 198 pièges durant tout le suivi. Les résultats entomologiques sont exprimés en nombre de spécimens de moustiques/piège, ce qui a permis de calculer le nombre moyen de moustiques (*Anopheles, Aedes et Culex*)/nuit. Les genres et espèces de moustiques capturés ont été identifiés par l'équipe d'entomologistes de l'OCEAC (J-C Toto), ce qui a permis d'évaluer les proportions relatives d'anophèles/piège et le nombre moyen d'*An. gambiae* /nuit.

VI-1-2- 3- Prélèvements de gouttes épaisses de sang sur lames et sur papiers buvards

Concomitamment aux activités entomologiques, l'équipe parasitologique (infirmiers, enquêteurs épidémio-entomologiques et superviseur) de la clinique SONAMET a réalisé chez chaque individu une goutte épaisse (GE) sur lame et des gouttes de sang sur papier buvard, durant la période d'étude (mars 2005 à janvier 2007), toutes les 6 semaines (**Figure 35**). Les gouttes de sang sur buvard étaient destinées au dosage, au laboratoire, par ELISA des Ac anti-protéines salivaires ; les GE sur lames ont permis d'évaluer la présence de *Plasmodium falciparum* (prévalence et densités parasitaires) et le comptage des gamétocytes chez chaque individu. Ceci nous a permis de calculer la prévalence et les densités parasitaires (charges parasitaires) moyennes et de suivre leur évolution au cours de la période d'étude. Dans notre étude, la prévalence parasitaire moyenne est exprimée en pourcentage d'indice plasmodique (%IP) et la densité parasitaire moyenne en parasites/µl de sang (en moyennes géométriques).

Le lot de papier-buvard recueilli au cours de ces différentes enquêtes a été utilisé pour le dosage des Ac anti-salive totale d'*An. gambiae* et anti-gSG6-P1 dans nos laboratoires à Dakar (ex-UR024, IRD-Dakar) et à Montpellier (Laboratoire-UR016) respectivement. Notre premier travail au laboratoire consistait à informatiser sur un ficher Excel tous les buvards disponibles, avec les différentes informations spécifiques à chaque individu (Numéros de case, de lame, le groupe, numéro et date de l'enquête, âge et sexe de l'individu) et famille. Après ce volet, une sélection des individus a été effectuée en se basant sur le nombre de fois où un buvard est disponible pour le même individu durant le suivi. Les individus à qui il manquait plus de 2 (sur 14 passages) prélèvements étaient exclus de la cohorte chez laquelle les dosages d'Ac anti-salive totale et anti-gSG6-P1 ont été menés. De ce fait, parmi les 230 individus de la population totale, seuls 109, enfants et adultes, ont fait l'objet de recherches d'Ac anti-salive et anti-gSG6-P1 et ont ainsi constitué notre « échantillon immunologique » ou sous-échantillon.

Toutes les gouttes de sang sur papier buvard ont été faites au même moment que les GE et les pièges lumineux, ce qui permet alors une comparaison entre nos résultats immunologiques et les données entomologiques et parasitologiques recueillies chez ces 109 individus.

Le consentement éclairé des personnes adultes et du parent ou tuteur de chaque enfant ayant participé à l'étude a été obtenu par écrit. L'étude a été approuvée par le Programme National de Lutte contre le Paludisme et le Ministère de la Santé de l'Angola (le 17 Octobre 2008), n'existant pas de comité d'éthique national dans le pays. L'ensemble des enfants ayant

participé à l'étude bénéficie d'un suivi médical de l'équipe MCP de la clinique de la SONAMET.

VI-2- Etudes « Sénégal »

Cette partie du projet de thèse visait à conforter les résultats de l'étude « LAV/Angola » dans une zone de transmission palustre différente par ses composantes environnementale, saisonnière et vectorielle. Elle a été menée dans 2 zones (urbaine et rurale) du Sénégal où la transmission du paludisme dure 3-5 mois avec cependant une intensité différente.

VI-2-1- Etude Pal-Fleuve (Paludisme dans la Région du Fleuve Sénégal)

Depuis l'hivernage 2004, l'étude Pal-Fleuve a été réalisée dans la vallée du Fleuve Sénégal où un suivi d'enfants (âgés de 1 à 9 ans) de trois villages de transmission palustre différente en intensité et vecteurs a été effectué :

i) le village de Mboula où la transmission du paludisme (juillet-novembre) est assurée par *An. gambiae*.

ii) le village de Mbilor où la transmission du paludisme est assurée à la fois par plusieurs espèces anophéliènnes, dont *An. gambiae* et *An. pharaoensis*.

iii) le village de Gankette Balla où la transmission est assurée par *An. funestus* seule, qui a fait son retour dans la zone à la suite de l'installation des barrages de Diama et de Manantali, de la fin de la saison des pluies au milieu de la saison sèche (janvier-mars).

Notre étude a été intégrée dans le projet « PAL-Fleuve », un réseau de recherche incluant i) les Drs. L. Konaté (Laboratoire d'Ecologie Vectorielle et Parasitaire, UCAD) et I. Dia (Institut Pasteur de Dakar) pour le volet entomologique, ii) les Drs. F. Roglérie, T. Diallo et G. Riveau (ONG Espoir pour la Santé, EPLS, St-Louis du Sénégal) pour le suivi clinique et parasitologique du paludisme et l'analyse de la réponse immune anti-*Plasmodium* et iii) le Dr. F. Remoue (IRD-UR016) pour le volet « réponse immune anti-salive d'anophèle ». L'étude PAL-Fleuve représente donc un programme multidisciplinaire incluant l'épidémiologie, l'entomologie, la parasitologie, l'immunologie et un aspect environnemental. Cependant, les résultats de cette thèse intègre uniquement le 3ème village de ce programme « Pal-Fleuve » : le suivi des enfants du village de Gankette Balla, village où *An. funestus* est le seul vecteur associé à la transmission de *P. falciparum*.

VI-2-1-1- Zone d'étude

Le village de Gankette Balla (15°58'48''N-15°55'48''W**)** est situé dans la partie sude du Lac de Guiers, à 63 km de Louga et à 263 km de Dakar (**Figure 36**). Il compte environ 1400 habitants appartenant en majorité à l'ethnie wolof. Les habitations sont surtout construites avec des murs en briques et des toits en tôle ondulée. On note également la présence de quelques habitations traditionnelles (cases en banco au toit recouvert de paille).

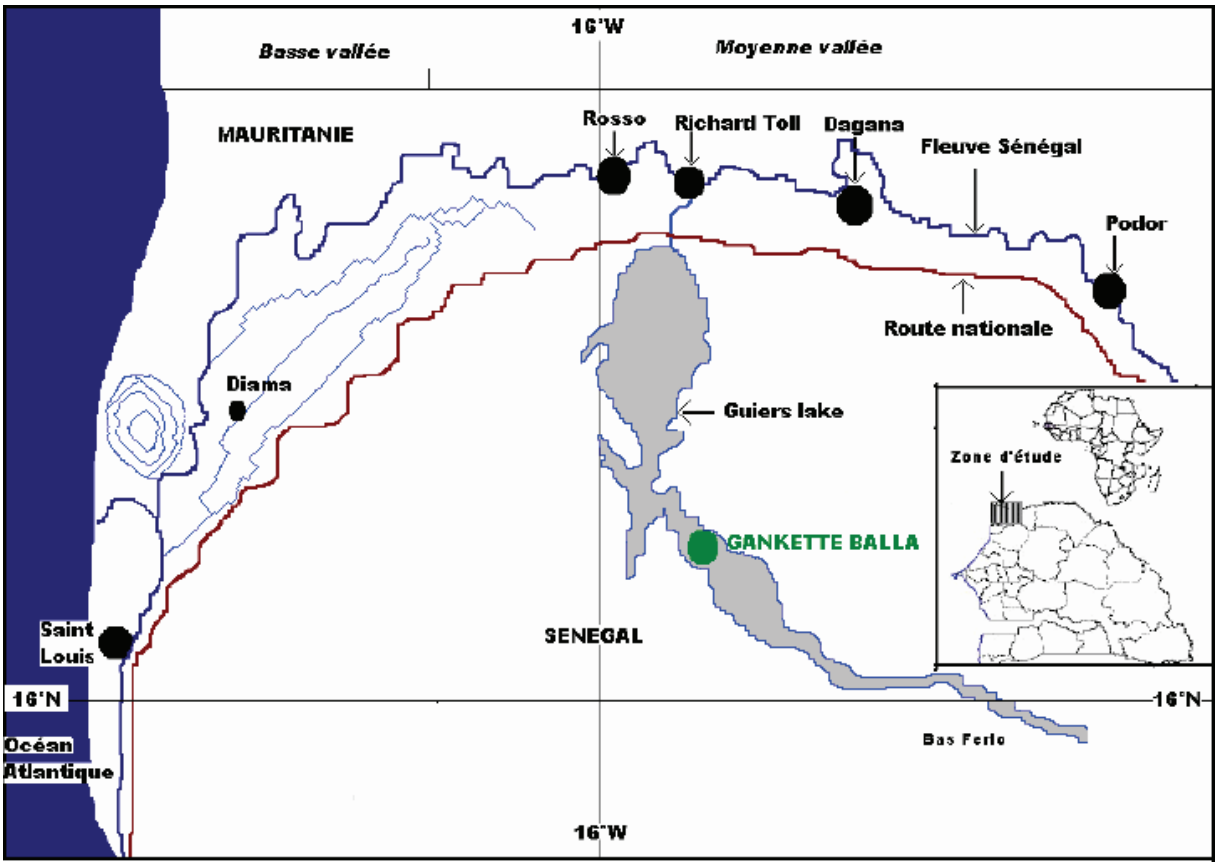


Figure 36: Localisation du village de Gankette Balla (en vert)

Le réseau hydrographique est représenté par le lac avec une présence massive des *Typha* (**Figure 36**) favorisant le développement d'espèces de moustiques telles qu'*An. funestus*. En 2004, année de l'étude, la pluviométrie moyenne annuelle enregistrée à la station de Keur Momar Sarr, située à 9 km du village, était de 223 mm. L'agriculture (mil, niébé, pastèques, …) et le maraîchage (oignons surtout) en saison sèche demeure les principales activités dans ce village. L'élevage y est peu développé et le bétail (chèvres, moutons et boeufs) est emmené pendant le jour en pâturage et parqué la nuit dans des enclos à l'intérieur des concessions.

Le paludisme y sévit de façon endémique du fait de la proximité du lac de Guiers (Faye *et al.*, 1998). La transmission de *P. falciparum*, espèce plasmodiale majoritaire, est assurée

exclusivement par *An. funestus* qui est présente en forte densités et est la seule espèce infectée dans la zone. La prévalence de *P. falciparum* dans ce village était de 7-8% en 2004-2005 et de 30% en octobre et décembre 2006 chez les enfants de 1-9 ans. Une particularité de ce village de Gankette Balla, en 2004, était la faible prévalence de *P. falciparum* (< 10%) malgré la très forte exposition à *An. funestus* (Dia *et al.*, 2008).

VI-2-1-2- Population d'étude

Le choix de ce village pour notre étude a été fait en fonction de notre 4ème objectif spécifique (voir **V-2-2-**). Ainsi, un suivi de la réponse Ac anti-gSG6-P1 a été effectué, entre juin 2004 et juin 2005, chez 120 enfants de 1 à 9 ans de ce village à *An. funestus*. Durant ce suivi longitudinal, des passages effectués tous les 3 mois (juin, septembre et décembre 2004, mars et juin 2005) ont permis de réaliser une goutte épaisse et un frottis chez chaque enfant pour évaluer la densité parasitaire et identifier les espèces plasmodiales. Des prélèvements au bout du doigt ont été aussi effectués durant chaque passage chez ces 120 enfants, et ceci a permis le dosage sérologique d'Ac IgG dirigés contre le peptide gSG6-P1 par ELISA. Des captures entomologiques ont aussi été menées durant chaque passage par nos collaborateurs entomologiques (équipe Drs. Konaté et Dia) (Dia *et al.*, 2008).

L'analyse des résultats issus des dosages de la réponse anti-peptides de gSG6 de cette étude a été faite au laboratoire de l'ex-UR024 (IRD, centre de Hann-Maristes, Dakar), celle des données entomologiques par l'équipe du Dr L. KONATE (UCAD) et I. DIA (Institut Pasteur de Dakar) et les données parasitologiques par l'équipe EPLS (St-Louis Sénégal). Les résultats de l'analyse des données immunologiques (réponse Ac anti-gSG6-P1/passage) ont été comparés à ceux des données parasitologiques (densité et prévalence parasitaires moyennes/passage) et entomologiques (densités anophéliènnes moyennes/passage), comme cela a été le cas avec l'étude Angola, dans l'optique de faire apparaître de possibles corrélations entre ces diverses méthodes de mesures d'exposition et/ ou de transmission. Une attention particulière a été aussi faite sur certains facteurs de variations de la réponse immunes anti-protéines salivaires telles que l'âge et la saison de transmission.

Avant, le démarrage de l'étude, le consentement éclairé des parents ou tuteurs dont leurs enfants ont participé à l'étude a été obtenu. L'étude a été approuvée en juin 2004 par le Comité National d'Ethique du Sénégal. L'ensemble des enfants ayant participé à l'étude bénéficie d'un suivi médical. Lorsqu'un cas palustre se présente, le traitement est assuré par l'ICP « Infirmier Chef de Poste » du village correspond, et pris en charge par EPLS.

VI-2-2- Etude Actu-Palu (Région de Dakar)

L'objet principal de ce projet était de caractériser l'environnement urbain dakarois afin d'aider à améliorer l'efficacité des stratégies thérapeutiques et préventives contre le paludisme, notamment en milieu urbain où le recours aux soins et aux méthodes de lutte et de prévention (MIIs et autres outils de lutte) répond à la fois à des facteurs médicaux, sociaux et économiques.

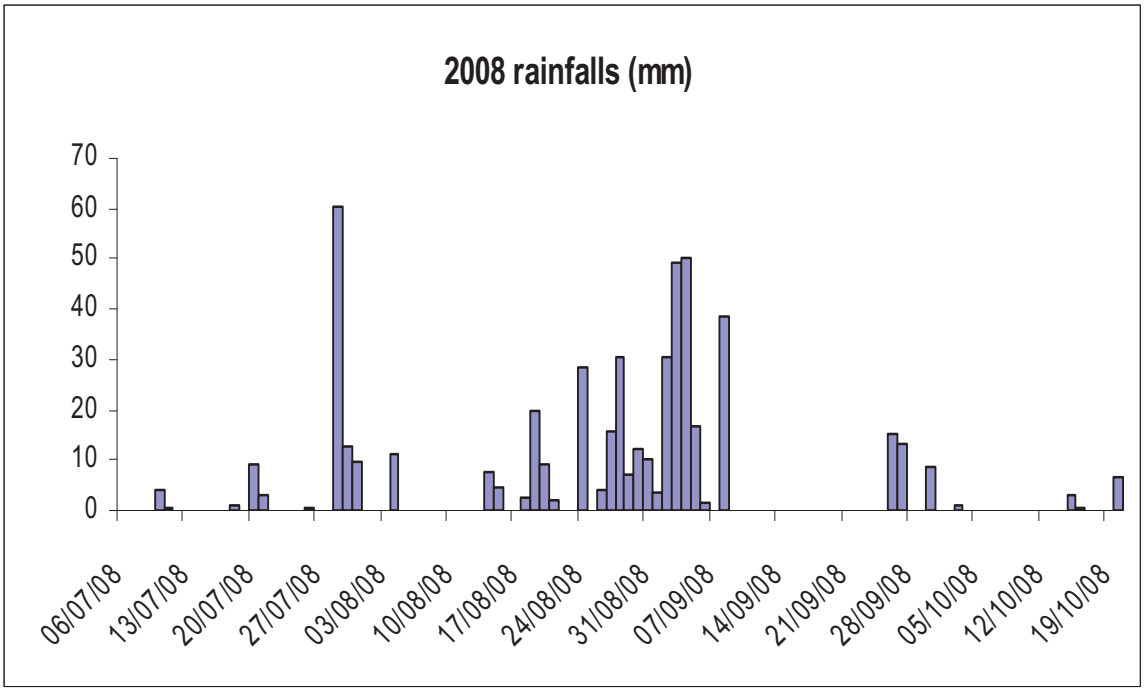
Ce projet a été financé par l'Agence National de la Recherche (Ministère de la Recherche de la France) et a regroupé plusieurs équipes de recherche : socio-démographes, géographes, anthropologues, économistes de la santé et épidémiologistes. La partie épidémiologie-santé de ce projet est menée en collaboration par les équipes des Drs. Jean-Yves Lehesran (IRD, UR010) et Richard Lalou (IRD, LPED).

Un des buts du programme EPIVECT dans cette partie épidémiologie-santé du projet Actu-Palu, donc de cette thèse, était d'évaluer le risque (degré d'exposition aux piqûres des moustiques vecteurs) et le poids (prévalence) du paludisme et l'efficacité de l'utilisation de diverses stratégies de lutte anti-vectorielle par les populations (MIIs, bombes aérosols, serpentins,…) de la région de Dakar (milieu urbain africain). Le paludisme urbain constitue aujourd'hui un enjeu éminemment social, économique et de santé publique (Hay *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2003). Il est, de ce fait, souvent vu comme étant le « paludisme de demain », surtout en Afrique sub-saharienne où l'accroissement des grandes villes est souvent accompagné d'un non développement des infrastructures économiques et sociales et d'une dégradation ou modification de l'environnement local (Knudsen and Slooff, 1992; Martens and Hall, 2000). Cette étude d'évaluation de l'exposition et de la prévalence a eu lieu entre octobre et décembre 2008 dans les communes urbaines de la région de Dakar.

VI-2-2-1- Zone d'étude

La région de Dakar (14° 43' 29,06" Nord, 17° 28' 24,06" Ouest) est localisée à l'extrême ouest du continent africain et de la péninsule du Cap-Vert. Elle est constituée de 4 communes urbaines (ou département administratifs : Dakar, Guédiawaye, Pikine et Rufisque) subdivisées en 42 communes d'arrondissement (CA). En 2008, sa population était estimée à 2 482 294 habitants, représentant ainsi 21% environ de la population du pays, avec une densité de 4459 habitants/km², de loin la plus forte du pays. Le point le plus haut est représenté par les Mamelles et se situe à 104 m au-dessus du niveau de la mer, la région étant dans son ensemble plate (plaines). Le climat est de type soudano-sahélien et côtier (du fait que la région soit presque entourée par l'Océan Atlantique). Une saison pluvieuse courte, entre fin

juin-début juillet et octobre (= hivernage), y alterne avec une longue saison sèche durant le reste de l'année (de début novembre à fin juin). Les températures les plus chaudes sont enregistrées durant la saison pluvieuse avec des moyennes comprises entre 24 et 30°C et les plus froides entre décembre et février. En 2008, la pluviométrie totale était de 510 mm avec un maximum en août et septembre (http://www.meteo-senegal.net/). La **figue 37** représente la répartition de pluies durant l'hivernage 2008 (période de l'étude) dans la région.



Source: http://www.meteo-senegal.net/

Figure 37: Distribution temporelle des précipitations enregistrées dans la région de Dakar durant l'hivernage 2008.

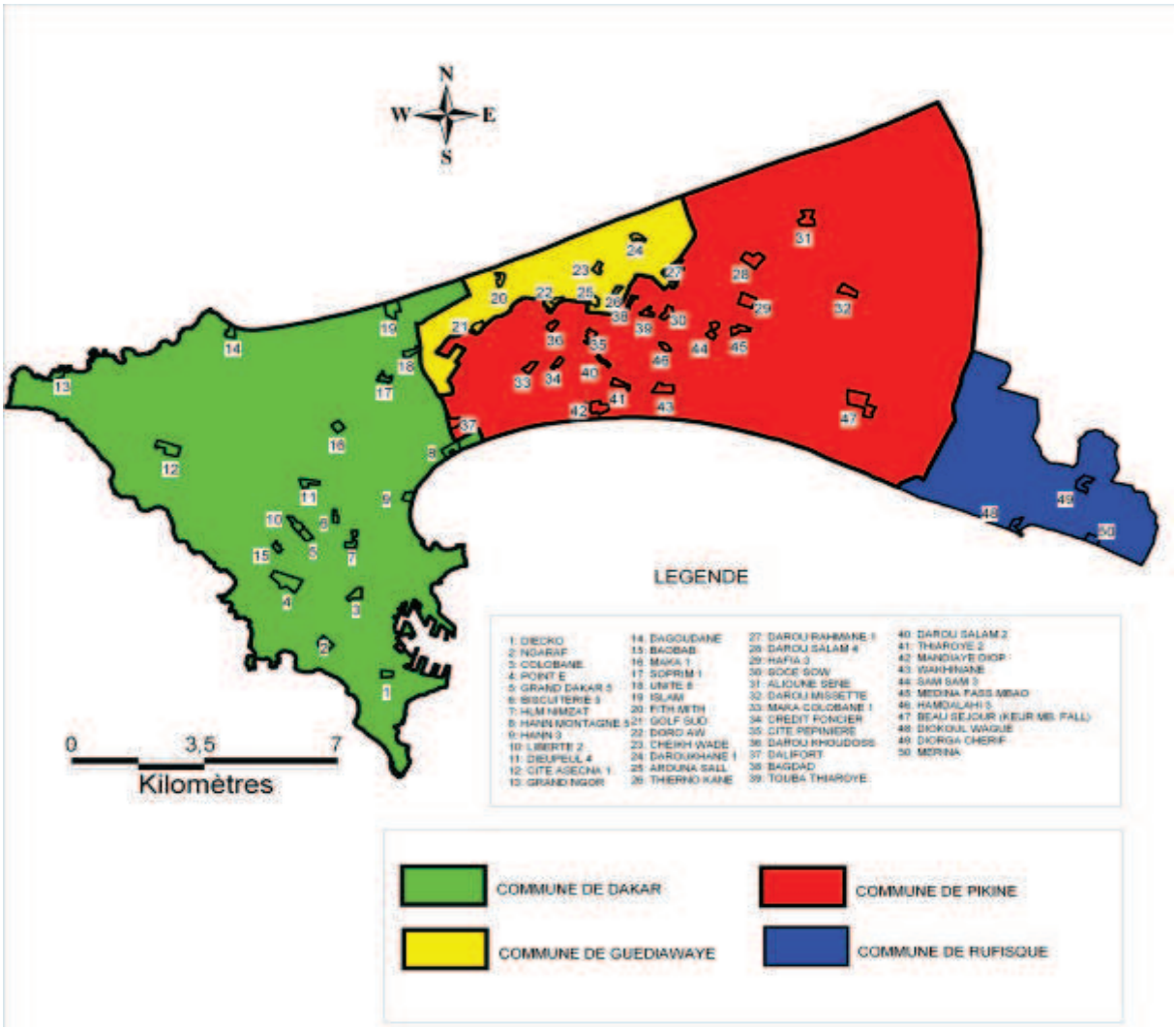
A l'instar de la plupart des grandes villes africaines, la prévalence du paludisme est faible à Dakar et est due surtout à *Plasmodium falciparum* transmis majoritairement par *An. arabiensis* (Diallo *et al.*, 2000; Pages *et al.*, 2008; Trape *et al.*, 1992), un membre du complexe *An. gambiae.* La transmission est faible et s'étend d'août à décembre avec un pic entre septembre et novembre. Cependant, elle se fait de façon très hétérogène dans la région (Trape *et al.*, 1992). Elle peut varier dans l'espace de 300 m du fait probablement des différences de degré et de type d'urbanisation, de densités de population, de qualité de l'eau et de l'aménagement, des mesures de lutte anti-paludique utilisées (surtout des mesures de lutte anti-vectorielle très fréquentes dans une zone urbaine), l'accès aux services de santé et aux

soins primaires et des facteurs propres aux ménages et quartiers (Machault *et al.*, 2009; Pages *et al.*, 2008).

VI-2-2-2- Sélection des sites et population d'étude

Chaque CA (42 au total) de la région de Dakar est subdivisée en districts de recensement (DR, au total un peu plus de 2000) renfermant au moins 1000 habitants chacun. Le DR constitue le niveau le plus fin, en termes de recensement démographique au Sénégal.

La première étape de notre travail concistait à cartographier les informations individuelles et des ménages des différents CA issues du recensement général de la population et de l'habitat de 2002 (caractéristiques socioculturelles et démographiques des individus, niveau économique du ménage…) qui a été mené par la Direction Nationale de la Statistique du Sénégal. Ensuite, une analyse en composantes principales effectuée sur les variables socio-démographiques et économiques a permis de résumer l'information censitaire au niveau des DR. Puis un plan factoriel, construit à partir des variables statistiquement discriminantes identifiées, a servi de base pour effectuer une classification des DR par la méthode des k-means (outil de classification classique qui permet de répartir un ensemble de données en k classes homogènes). Ainsi, cinq types de DR ont pu être individualisés dans l'ensemble des CA. Un des DR du type le plus représentatif (classe ou type de DR majoritaire) de chaque CA a été tiré au sort pour figurer dans l'échantillon final. De ce fait, 42 DR ont été ainsi sélectionnés de façon randomisée. Le programme ayant prévu 50 zones d'enquêtes, 8 sites supplémentaires ont été choisis en fonction leur localisation (à proximité d'un bas fond), de la densité de la population et leurs caractéristiques socio-économiques afin de tenir en compte "l'effet quartier". Dans cette étude, 60 ménages par site sélectionné, donc 3000 (60*50) ménages étaient prévus. La **figure 38** représente les 50 zones enquêtées.



Carte: A. Ndonky (IRD de Dakar)

Figure 38 : Représentation des 50 sites d'étude (Actu-Palu 2008) sur la carte de la région de Dakar.

Chaque site enquêté a été ainsi visité par une équipe d'enquêteurs socio-démographiques afin d'identifier les ménages à étudier. La zone d'étude était ainsi divisée en cinq îlots (un îlot par équipe d'enquêteurs). Etant donné qu'une liste actualisée des ménages n'était pas disponible, l'enquêteur sélectionnait tout d'abord une concession selon un itinéraire de déplacement pré-établi par le superviseur. Le premier critère pour la sélection d'un ménage était la présence d'un enfant âgé entre 2 et 10 ans. Si cette concession était composée de plusieurs ménages, l'enquêteur déterminait le ménage sélectionné à partir du prénom du chef de ménage (premier par ordre alphabétique). Après l'accord de la famille (du chef de ménage le plus souvent), un questionnaire complet sur le mode de vie du ménage, revenu, mode d'accès aux soins, était rempli. L'infirmier passait par la suite dans le ménage pour réaliser des prélèvements sanguins (GE sur lame et sur papier buvard) et pour l'enquête santé-

épidémiologique. En effet, un adulte (femme du ménage ayant répondu le questionnaire socio-démographique) et un enfant âgé entre 2 et 10 ans de ce même ménage ont subit un prélèvement sanguin du doigt. Ce qui a permis de réaliser une goutte épaisse sur lame (pour l'étude de la prévalence parasitaire) et sur papier buvard (pour l'étude de la réponse anticorps anti-protéines salivaires). De temps en temps (dans un peu moins du 1/3 des ménages) un homme (père de famille par exemple) adulte est prélevé. Après le prélèvement, l'infirmier posait une série de questionnaires épidémiologiques aux adultes (femme et homme). Ces questionnaires portaient essentiellement sur l'utilisation des ACTs, des MIIs ou autres méthodes de lutte contre les moustiques, la perception des piqûres des moustiques…

En tout, en tenant compte des refus et absences, un peu plus de 2500 (un peu plus de 5000 individus) ménages prélevés de 45 des 50 DR ont été prélevés. Les sites Diecko, Point E, Liberté 2, Baobab et Maka 1 ont été exclus de l'étude du fait des nombres très élevés de refus enregistrés. Les prélèvements sur papier buvards ont été stockés à 4°C au laboratoire de de l'IRD à Dakar puis à l'UR016 à Montpellier où ils ont été élués puis utilisés pour les dosages d'Ac par ELISA. Cependant, pour des raisons matérielles, les dosages d'Ac spécifiques n'ont été menés que chez un échantillon d'individus de 1435 ménages. En effet, avec une commande du logiciel « R » (« Rgui »), une sélection aléatoire de 30-35 sur x (puisque nombre de ménage prélevé très variable/site) ménages prélevés. Pour certains sites le nombre de ménages prélevés n'avait pas atteint 30-35. Les ménages de ces sites étaient alors tous inclus dans l'échantillon. Au total, les dosages d'Ac spécifiques ont été effectués chez près de 3025 individus (1435 ménages), 1435 enfants de 2-10 ans et 1590 adultes (1435 femmes et 155 hommes).

Des études entomologiques (captures de moustiques sur appâts humains et prospections larvaires) ont été menées entre juillet et fin décembre 2008 dans plusieurs sites de la région dakaroise, incluant donc la période (début octobre- fin décembre) et certains sites (16 sites) de notre étude (**Tableau 2**), par l'équipe de Dr. F. Pages (IMTSSA, Pharo, Marseille) et de l'UR077-IRD de Dakar. En effet, des moustiques adultes ont été capturés toutes les deux semaines, durant 2 nuits successives (de 19h du soir à 7h du matin) à l'intérieur et à l'extérieur des points de capture. Deux hommes faisaient des rotations tous les 2h dans chaque point de capture. Des rotations de « captureurs » d'un point de capture à un autre étaient aussi effectuées afin de minimiser au maximum les biais. Les données de ces études entomologiques ont étés comparées aux résultats des dosages Ac anti-gSG6-P1 dans les DR correspondants. Les moyennes des densités anophéliènnes (données entomologiques) ont été calculées en tenant en compte que les captures effectuées depuis le début de l'étude

entomologique (fin juillet – début août, en fonction des sites) jusqu'à la date du prélèvement de buvards dans chacun des sites d'études.

Un consentement éclairé était demandé lors de l'interview des ménages. Pour les mineurs, un consentement a été demandé au tuteur légal. Ce protocole a reçu l'aval du comité d'éthique du ministère de la santé du Sénégal (n° SEN 12/08).

Tableau 2 : Date et nombre d'échantillonnages entomologiques dans les sites communs aux études Actu-Palu et Entomo-Dakar.

Districts	Blood sampling dates	1st-day mosquitoes sampling	Last-day mosquitoes sampling	Number of sampling nights
Ngaraf (Medina)	27-Dec-08	8-Aug-08	19-Dec-08	10
Biscuiterie (Grand-Dakar)	29-Nov to 2-Dec-08	5-Aug-08	26-Nov-08	9
Hann Montagne	4 to 9-Oct-08	29-Jul-08	6-Oct-08	6
Hann 3	11 to 16-Oct-08	29-Jul-08	6-Oct-08	6
Dieupeul 4	1 to 9-Nov-08	6-Aug-08	29-Oct-08	7
Cité ASECNA 1	4 to 11-Oct-08	5-Aug-08	6-Oct-08	5
Yoff Dagoudane	10 to 13-Nov-08	5-Aug-08	10-Nov-08	8
Cite SOPRIM	25 to 30-Oct-08	30-Jul-08	22-Oct-08	7
Golf Sud	22 to 27-Nov-08	2-Aug-08	21-Nov-08	9
Cheikh Wade (Guédiawaye)	20 to 26-Nov-08	11-Aug-08	17-Nov-08	8
Arouna Sall (Guédiawaye)	22 to 23-Nov-08	11-Aug-08	1-Dec-08	9
Thierno Kane (Guédiawaye)	20 to 22-Nov-08	11-Aug-08	17-Nov-08	8
Maka Colobane (Pikine)	8 to 13-Nov-08	29-Jul-08	3-Nov-08	8
Cité Pépinière (Pikine)	15 to 20-Nov-08	29-Jul-08	17-Nov-08	9
Darou Khoudoss (Pikine)	23 to 27-Nov-08	29-Jul-08	17-Nov-08	9
Darou Salam 2 (Pikine)	8 to 13-Nov-08	29-Jul-08	3-Nov-08	8

VI-3- Etude « Bénin »

Les facteurs conditionnant la survenue des premières infections et accès palustres sont très mal connus alors que le paludisme représente une des premières causes de mortalité des nouveau-nés et des jeunes enfants dans les pays en développement. L'hétérogénéité de l'espace de vie des jeunes enfants occasionne des variations considérables du niveau de transmission vectorielle, et donc l'étude de la transmission entomologique dans les lieux où vivent les nouveau-nés est indispensable à la compréhension de la dynamique et de l'expression clinique des premières infections. Par ailleurs, des facteurs individuels spécifiques jouent également un grand rôle. Par exemple, la notion d'une infection placentaire à la naissance conditionne fortement la probabilité, à niveau égal d'exposition, de développer une infection dans la première année de vie. Le but principal de cette étude est d'identifier les

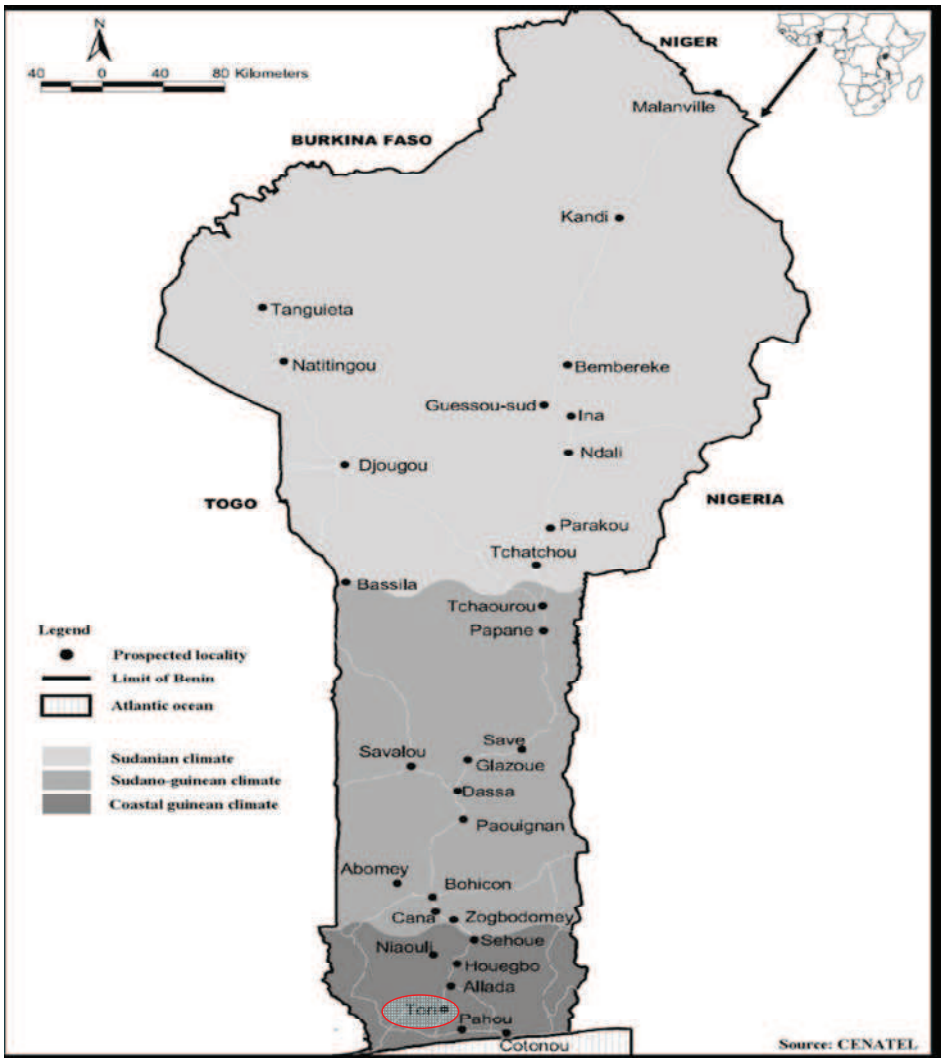
principaux facteurs de risque de survenue des parasitémies palustres durant les premiers mois de vie afin de mieux comprendre la dynamique de leur apparition et de leur expression et de pouvoir aider à proposer des interventions en santé publique permettant de protéger prioritairement ce groupe à risque. Cette étude pluridisciplinaire (entomologie, parasitologie, génétique, biologie moléculaire, épidémiologie et approche environnementale) est le fruit d'un partenariat étroit entre la Faculté des Sciences de la Santé (FSS) de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin), l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA) de Cotonou et l'IRD représenté par les UR010 et UR016 présentes à Cotonou et au Bénin. L'objectif du programme EPIVECT (UR016) dans ce projet, inclus dans cette thèse, est d'évaluer et suivre le taux d'Ac anti gSG6-P1 au cours des premiers mois de vie chez ces nouveau-nés vivant en zone de forte endémicité palustre, donc valider le peptide gSG6-P1 comme biomarqueur d'exposition chez les très jeunes enfants, et de comprendre les facteurs influençant l'acquisition de la réponse Ac (IgG et IgM) anti-protéines salivaires au cours des premières piqûres de moustiques.

VI-3-1- Zone d'étude

Cette étude a été menée au Sud du Bénin (**Figure 39**), dans la zone de Tori Bossito (2°89 E et 6°30 N), zone rurale où la transmission du paludisme est permanente et varie selon les précipitations.

Le climat y est de type costal, tropical humide et chaud (climat guinéen costal ou sub-équatorial). Il est caractérisé par deux saisons de pluies (du début avril à fin juillet pour la grande et de mi-septembre à mi-décembre pour la petite) et deux saisons sèches (mi-décembre à fin mars pour la grande et d'août à mi-septembre pour la petite). Les moyennes annuelles des précipitations varient de 1500 mm à plus de 2000 mm. *An. gambiae* et *An. funestus* y sont les principaux vecteurs du paludisme (Akogbeto *et al.*, 1992, Djogbenou *et al.*, 2010). *An. melas,* très fréquent dans les zones côtières ou littorales, peut aussi un rôle important dans la transmission du paludisme (Akogbeto *et al.*, 1992). *P. falciparum* est l'espèce parasitaire très largement dominante (97,1 %). *P. malariae* représente les 2,9 % restant (Akogbeto *et al.*, 1992).

A l'instar de tout le pays, le paludisme y est la première cause de morbidité surtout chez les enfants de moins de 5 ans : son taux d'incidence moyen est de 65,8 pour 1000 et il représente plus de 30 % des motifs de consultation externe (Josse *et al.*, 1994).



<u>Figure 39</u> : Carte de la république du Bénin montrant la zone d'étude (encerclé en rouge)

VI-3-2- Population d'étude

Cette étude a concerné des femmes et des jeunes enfants (nouveau-nés) sélectionnés à partir de 2 maternités (Tori Cada et Tori Avamé) de la zone sanitaire de Tori Bossito. Ces deux maternités accueillaient les populations de femmes (enceintes ou non) et d'enfants de 9 villages. Lors de leur arrivée en salle d'accouchement, l'étude a été expliquée aux femmes enceintes, et un accord de participation leur a été demandé (consentement éclairé signé). L'ensemble des explications a été donné en langue vernaculaire de même que le document de consentement écrit. A la naissance, des informations cliniques et parasitologiques, ainsi que d'autres caractéristiques (poids, taille, durée gestation, antécédents de la femme, utilisation de méthode de lutte antipaludique lors de la grossesse…), ont été recueillies chez les nouveau-nés et/ou chez leurs mamans. Ainsi, 550 nouveau-nés ont été recrutés et suivis de la naissance jusqu'à l'âge de 18 mois. Au cours de ce suivi, des données parasitologiques et cliniques ont

été recueillies. Ces suivis ont permis de caractériser les premières infections et les premiers accès cliniques chez les nouveau-nés. En cas de maladie (fièvre confirmée par un diagnostic parasitologique), l'enfant était traité conformément aux recommandations du Programme National de Lutte contre le Paludisme du Bénin (le traitement présomptif recommandé au Bénin chez les enfants de moins de 5 ans est l'association arthéméter et luméfantrine : Coartem®). A 3 (M3), 6 (M6), 9 (M9), 12 (M12) et 18 (M18) mois, des gouttes épaisses de sang total sur papier buvard ont été réalisées pour la recherche d'Ac anti-protéines salivaires (gSG6 –Peptide 1). Certains enfants ayant été exclus au cours de l'étude (décès, pas de prélèvement, prélèvements pas encore acheminés au laboratoire…), les dosages n'ont été effectués que sur 127 individus. Pour ces mêmes enfants, seuls les prélèvements de 3 à 12 mois étaient disponibles au moment de faire les dosages qualitatifs et quantitatifs d'Ac anti-gSG6-P1 par ELISA. Des Ac anti-gSG6-P1 ont aussi été recherchés dans le sang du cordon ombilical (CO) et le sang périphérique de leur mère respective à l'accouchement (CI), ce qui permettra d'évaluer la transmission des Ac anti-salive maternels à l'enfant (passage transplacentaire d'Ac anti-gSG6-P1) et leur évolution chez l'enfant (évaluation l'acquisition de la réponse immune (Ac) spécifique de l'enfant).

Même si les caractéristiques de ces 3 zones d'étude de ce projet de thèse étaient différentes dans leurs composantes environnementales et épidémiologique du paludisme, les méthodes de laboratoire utilisées étaient les mêmes et sont, avec les méthodes statistiques utilisées, présentées dans les chapitres suivants.

VI-4- Analyses au laboratoire

VI-4-1-Production des antigènes utilisés

Deux types d'antigènes ont été utilisés dans nos expériences : la salive totale d'*An. gambiae* et des peptides synthétiques P1 de la protéine gSG6 de la salive d'*Anopheles*.

VI-4-1-1- Récolte de la salive

La salive totale a été collectée à partir de moustiques femelles *An. gambiae s.s.*, élevés dans l'insectarium des ex UR024 et UR077 (actuelle UMR 198) de l'IRD de Hann Maristes, grâce à une technique de prélèvement de salive pure mise au point par une équipe finlandaise (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1994) et améliorée au laboratoire de l'ex UR024 par notre équipe (**Figure 40**) (Remoue *et al.*, 2006).

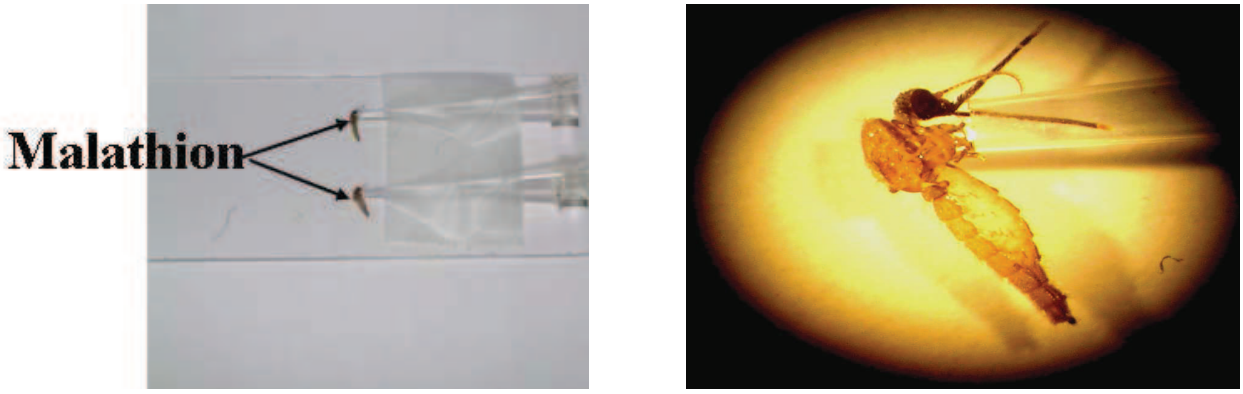


Figure 40 : Technique de Salivation de moustiques au laboratoire (Remoue *et al.*, 2006).

Des femelles anophèles non infectées *An. gambiae s. s*., âgés de 8 à 14 jours, mises dans un gobelet en plastique couvert d'une tulle laissant un trou fermé par du coton, sont endormies par du CO_2. Leurs pattes et ailes (organes de locomotion) sont retirées du thorax sous loupe binoculaire en s'aidant de petites pinces et aiguilles. Avec des minuties (0,25mm d'épaisseur), le proboscis du moustique est introduit dans un cône plastique (cône Finitip) contenant 10 µl de tampon Hepes/NaCl/EDTA (voire annexe 1). Ces cônes ont été préalablement fixés sur une lame de verre avec du scotch. Une application topique de 0,1-0,2µl de malathion (insecticide de la famille des organophosphorés), dilué en acétone à 0,25%, est alors effectuée au niveau du thorax de l'insecte. Ceci excite le moustique et favorise la salivation. Après une heure de salivation, le liquide contenu dans le cône (salive + tampon) est collecté pour chaque moustique et regroupé, dans un tube Eppendorf, avec la salive des autres moustiques récoltée le même jour. Un lot de salive/journée de salivation, auquel est ajouté 2 µl d'inhibiteur de protéases, est ainsi obtenu et conservé au congélateur (à -80°C) jusqu'à utilisation. Cette technique de salivation permet de récolter par jour 100 à 400 µg/ml de protéines salivaires correspondant entre 20 et 75 µg/moustique. Les lots de salive sont alors regroupés en pools pour les expérimentations immunologiques, après avoir estimé la quantité de protéines qu'ils contiennent et vérifié leur antigénicité.

VI-4-1-2- Identification et obtention du peptide gSG6-P1

La protéine gSG6 (*An. gambiae* Salivary Gland Proteins family 6) est une petite protéine (en réalité un peptide) de poids moléculaire d'environ 13kDa. Sa séquence comporte 10 résidus cystéine probablement à l'origine de cinq ponts di-sulfures. Son rôle reste à être clarifié. Des travaux ont montré que l'expression du gène codant pour gSG6 est seize fois plus

importante chez les femelles que chez les mâles suggérant un rôle de cette protéine salivaire dans le repas sanguin du moustique (Arca *et al.*, 2005, Calvo *et al.*, 2006a). Elle a été également retrouvée au niveau des glandes salivaires d'*An. stephensi* et *An. funestus* mais non chez *An. darlingi* (Calvo *et al.*, 2007). La figure 7 présente les séquences de la protéine SG6 chez *An. gambiae, An. stephensi* et *An. funestus.*

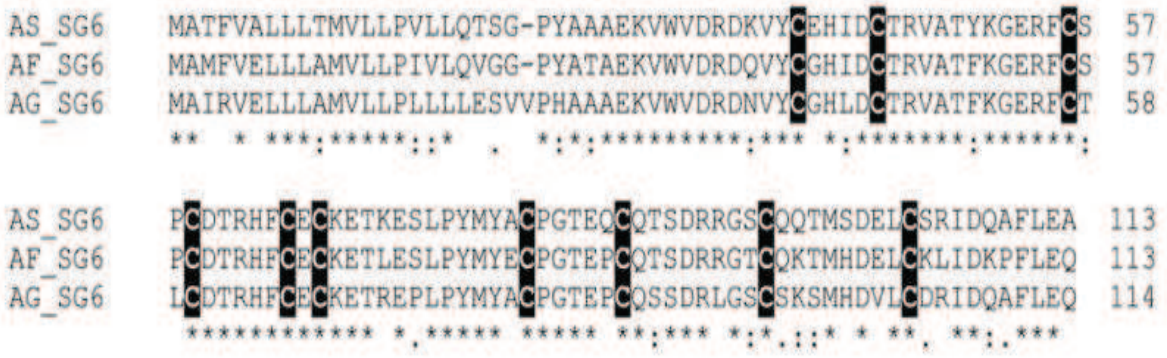


Figure 41: Alignements des séquences de gSG6 chez 3 espèces d'*Anopheles*, *An. stephensi* (AS), *An. funestus* (AF) et *An. gambiae* (AG). Les cystéines sont ombrées. Les identités sont indiquées avec (*), une forte conservation en acide aminé par (:) et une conservation d'acides aminés avec (.). D'après (Calvo *et al.*, 2007).

L'antigénicité de recombinantes de cette protéine a été démontrée, par la technique d'Immunoblotting 1D, chez des individus faiblement exposés (militaires en mission en Afrique) aux piqûres d'*Anopheles* (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007) et chez des enfants sénégalais exposés aux piqûres d'*An. gambiae*, par Immunoblotting 2D (Cornélie, communication personnelle) et par ELISA (Poinsignon *et al.*, 2008a). Mais face aux problèmes de spécificité et de rendement dans la production de cette protéine sous formes recombinantes, une stratégie « peptide » a été développée en combinant des analyses bio-informatiques et des alignements de séquences (Poinsignon *et al.*, 2008a) (**Figure 42**).

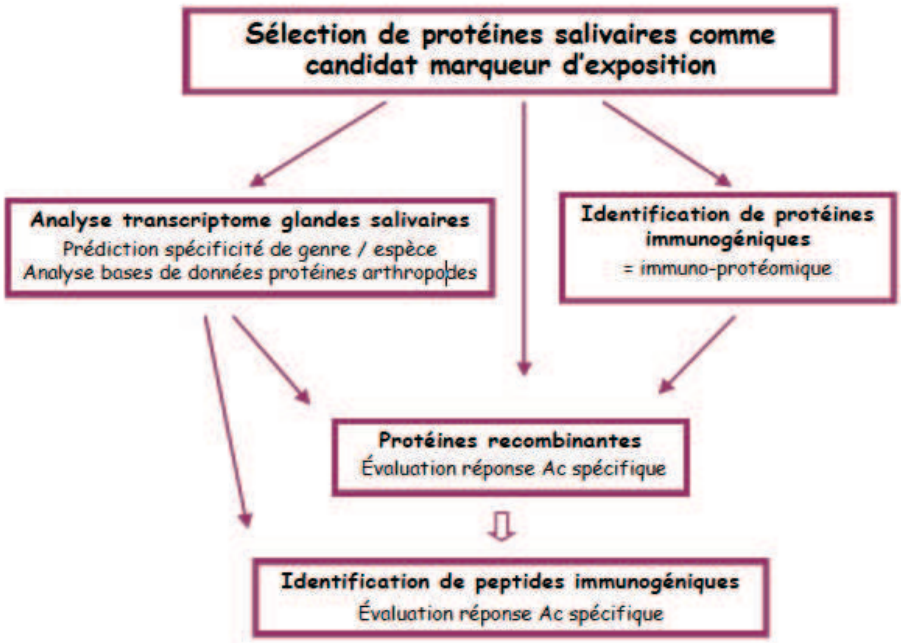


Figure 42 : Stratégies permettant l'identification de candidats salivaires pour l'élaboration de marqueur d'exposition. D'après (Poinsignon *et al.*, 2008a)

Cette stratégie a permis d'aboutir à l'identification de 5 peptides (gSG6-P1 à gSG6-P5) potentiellement antigéniques. Les analyses bio-informatiques nous ont permis de prédire leur antigénicité par des sites web spécialisés en la matière (FIMM, SeqFacts, EBI), la présence d'épitopes de cellules B (LB) par les bases de données ABC Pred, BepiPred, BcePred et leur affinités avec des peptides récepteurs CMH de classe 2 par des services en ligne tel que Pro-Pred1, Expasy, SYFPEITHI. Les alignements de séquences ont permis de comparer ces peptides avec le génome ou sialome d'autres vecteurs et autres organismes vivants grâce à des bases de données telles que Vectorbase ou BLAST.

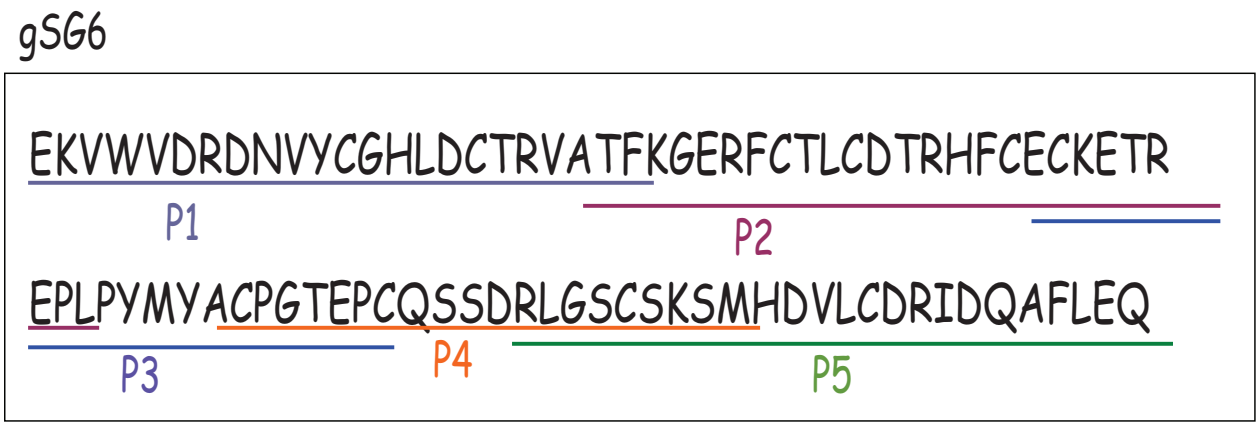


Figure 43: Séquence d'acides aminés des 5 peptides sélectionnés de la protéine gSG6. D'après (Poinsignon *et al.*, 2008a)

Ces peptides ont été par la suite synthétisés et leur immunogénicité testée : deux d'entre-eux étaient les plus antigéniques (gSG6-P1 et gSG6-P2) confirmant ainsi les résultats des prédictions bio-informatiques d'antigénécité. Cependant, le gSG6-P1, dont la séquence était très conservée entre espèces d'anophèles (au sein du genre *Anopheles*), semblait être le plus pertinent comme candidat marqueur d'exposition (Poinsignon *et al.*, 2008a). Ce dernier a été synthétisé et purifié (> 95%) par Genepep (St-Clément de Rivière, France). Au labo, les lots de peptides étaient lyophilisés et dissous dans de l'eau ultra pure autoclavée, répartis en plusieurs pools de 500 µl puis rangés congélateur (à -80° C) jusqu'à leur utilisation.

VI-4-2- Elution des gouttes épaisses de sang totale sur papier buvard

Les buvards sont élués grâce à une technique développée et mise au point par notre équipe.

Sur le terrain, par prélèvement au bout du doigt, une goutte de sang est déposée dans un cercle (avec du crayon noir) dessiné sur le papier, ce qui permet de calibrer la quantité de sang déposé. Puis la goutte est étalée sans débordement dans le cercle. A côté de chaque cercle, le numéro d'identification (NI) de l'individu est indiqué, ainsi que la date de prélèvement et le non du site étudié (**Figure 44**).

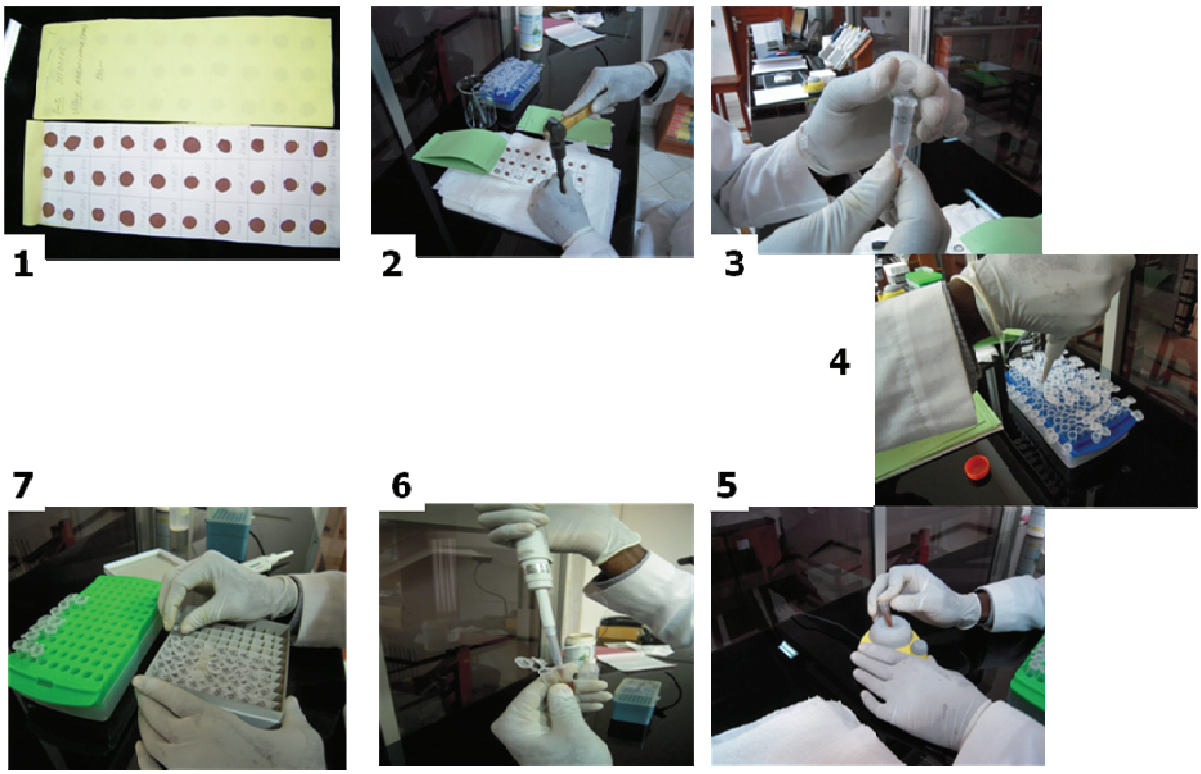


Figure 44 : Prélèvement et élution de gouttes de sang total sur papier buvard (papier Watman A3)

Tous les buvards ont été conservés, durant les premières heures suivant le prélèvement, à température ambiante dans des sachets fermés et contenant du Silicagel (qui aspire l'humidité). Ils sont stockés dans un classeur sur lequel sont inscrits le nom du village, le groupe et la date du passage. Enfin, au laboratoire, ils sont gardés au frigidaire à +4°C jusqu'à leur utilisation pour élution. L'élution (**Figure 44**) est une technique qui nous a permis d'obtenir des sérums (plus précisément éluats) utilisés pour les dosages immunologiques par ELISA. L'élution des buvards se fait par les étapes successives suivantes :

- Le découpage de chaque cercle de buvard contenant une goutte de sang à l'aide d'une paire de ciseaux préalablement désinfectés avec de l'alcool 70% puis séchée.
- Puis l'introduction avec des pinces du cercle découpé du papier buvard dans un tube Eppendorf de 1.5 ml sur lequel le NI de l'individu concerné a été préalablement écrit avec un marqueur indélébile.
- Ensuite l'ajout de 350 µl de tampon PBS (-Tween 0.1%) dans chaque tube Eppendorf avant de placer ce dernier au réfrigérateur à +4°C pendant 24h.
- Après 24h, on regarde si la goutte est bien éluée (milieu liquide rougeâtre alors qu'il ne reste que quelques traces de sang sur le papier).
- Enfin on récupère le liquide du tube (= éluat) et le transfère dans un autre tube Eppendorf préalablement identifié par le même NI et le congeler à -20° c jusqu'à utilisation.

VI-4-3- Technique de dosages immunologiques par ELISA

Principe :

L'ELISA (Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay) est une technique quantitative utilisée pour détecter des anticorps (anti-parasitaires, anti-bactériens, etc.) dans un lique biologique (sang, sérum, éluat, lymphe, …) en utilisant des anticorps secondaires anti-anticorps humains conjugués à une enzyme (peroxydase, phosphatase). La densité optique (DO) est proportionnelle à la quantité d'anticorps qui se sont fixés spécifiquement sur les antigènes. Dans notre étude, l'antigène (salive totale ou gSG6-P1) est fixé au fond du puits en plastique où sont ensuite déposés les éluas contenant potentiellement les anticorps spécifiques recherchés. La détection des Ac spécifiques est ensuite révélée par un système enzymatique comme indiqué ci-dessous :

Mode opératoire (Figure 45) :

a- Fixation au fond des puits d'une plaque en plastique de 96 puits (Nunc, Roskild, Danemark) de la salive d'*An. gambiae* (contenant des antigènes) diluée au 1/200ème en tampon

carbonate-bicarbonate (pH 9,6) ou du peptide gSG6-P1 diluée dans du tampon PBS (Phosphate Buffered Saline; pH=7,4±0,2) (pour chaque puits : 2µl de solution mère de peptide dans 98 µl de tampon) et incubation à l'étuve MEMMERT 37°C pendant 2h30 min. Des puits sans antigènes (ou puits Ag-) ont été réalisés comme contrôle pour chaque éluat. Cette étape est appelée le **« coating »** qui consiste donc à fixer les antigènes au fond des puits des plaques ELISA.

- Lavage (4 fois) avec le tampon de lavage, constitué d'eau déminéralisée + Tween 0.1%

b- Saturation avec dépôt de 200 µl de Blocking Buffer (BB) (Thermo Scientific, Rockford, USA) qui, grâce à des protéines libres (TBS), se fixe sur les parties des puits de la plaque ELISA laissées libres par la non fixation des antigènes (salive totale ou gSG6-P1), puis incubation à l'étude pendant 45 minutes.

- Lavage (4 fois) avec le tampon de lavage

c- Dépôt des éluats, contenant potentiellement les Ac recherchés, dilués au 1/20ème dans du tampon (PBS + Tween 1%) et incubation au frigidaire à +4°C pendant une nuit. Les Ac contenus dans les éluats vont se fixer spécifiquement sur les antigènes salivaires qui, eux-même, se sont préalablement fixés au fond des plaques.

- Lavage (4 fois) avec le tampon de lavage

d- Dépôt et incubation à l'étuve (37° C pendant 1h30 min) des anticorps biotinylés de souris anti-IgG humains (=anticorps conjugués ou secondaires) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), dilués au 1/1000ème (pour la salive totale) ou au 1/2000ème (pour le peptide gSG6-P1) dans du tampon (PBS + Tween 1%). Ces Ac secondaires vont se lier avec les Ac principaux des éluats (Ac recherchés) selon une certaine spécificité.

- Lavage (4 fois) avec le tampon de lavage

e- Dépôt de la Streptavidine-Biotine couplé à l'enzyme Peroxydase (SBP, complexe enzymatique qui se fixe sur l'anticorps secondaire biotinylé) (AmerSham, Les Ulis, France) dilué au 1/1000ème (pour la salive totale) ou au 1/2000ème dans du tampon (PBS + Tween 1%) et incubation à l'étuve (37° C pendant 1h). Cette étape constitue l'étape d'amplification.

- Lavage (8 fois) avec le tampon de lavage

f- Dépôt du substrat de l'enzyme (peroxidase), l'ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium) (Sigma, Saint-Louis, MO, USA) dilué dans tu tampon citrate (pH=4) + de l'eau oxygénée (H_2O_2) (ajoutée juste au moment du dépôt de la solution d'ABTS). Cette phase constitue la révélation.

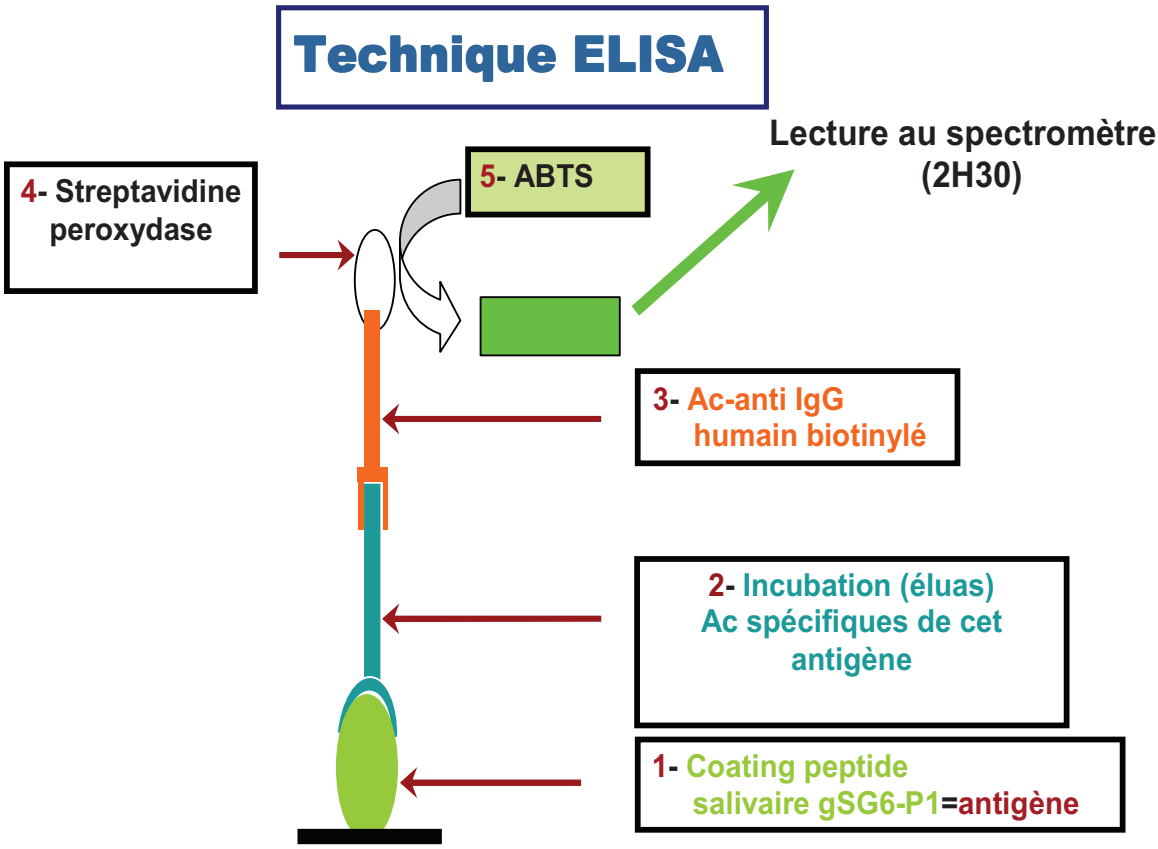


Figure 45 : Etapes du dosage d'Ac anti-protéines salivaires par la technique ELISA

La lecture, après 2h, de la Densité Optique (DO) de la couleur verte de la solution se fait grâce à un spectromètre Multisakan Ascent (Thermo Labosystems). La DO lue est proportionnelle à la quantité d'Ac spécifiques fixée sur l'Ag.

Pour l'exploitation des résultats, les valeurs des DO des puits sans antigènes (Ag -) ont été soustraites de celles des DO des échantillons correspondants (puits Ag+). Les résultats ont été exprimés en delta de DO (ΔDO) qui constituent ainsi les réponses Ac spécifiques:

$$\Delta DO_{ind} = DO_x - DO_n$$

Avec DO_x la moyenne des DO des 2 puits Ag+ et DO_n la valeur de la DO du puits Ag- de l'individu.

L'évaluation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez 14 individus-témoins (ayant toujours habité Lille, Nord de la France) n'ayant jamais connu une histoire d'exposition aux piqûres des anophèles dans les 6 mois précédant leur prélèvement (pas voyagé en zone d'endémie durant ces 6 mois, par exemple) nous a permis de calculer un seuil répondeurs (SR) et donc d'estimer la réponse IgG anti-gSG6-P1 non spécifique selon la formule suivante : SR = moyenne ($\Delta DO_{témoins}$) + 3SD ($\Delta DO_{témoins}$) = 0,204

Où SD (Standard Deviation) est l'écart type des ΔDO de ces 14 individus et ΔDO donné par la formule: $\Delta DO = DO_x - DO_n$. DO_x représente la moyenne des valeurs des densités optiques (DO_1 et DO_2) des duplicates avec antigène (2 puits Ag+) et la valeur DO de la densité optique du puits sans antigène (Ag-) d'un individu donné.

Un individu était considéré comme répondeur si la valeur de son ΔDO était supérieure à la valeur du seul répondeur (0,204). Si $\Delta DO_{ind} > 0{,}204 \Rightarrow$ l'individu exposé était considéré comme répondeur. La proportion (%) de répondeurs était calculée pour chaque passage par la formule suivante:

$$\boxed{\%\ \mathrm{R\ (passage)} = (NR/NP) * 100}$$

NR est le nombre de répondeurs et NP le nombre de prélèvements dosés en IgG anti-gSG6-P1 pour chaque passage.

Des puits sans éluats (tampon PBS + Tween) et des puits positifs (sérum positif en Ac anti-salive) ont systématiquement été réalisés pour évaluer la reproductibilité entre chaque les plaques d'une même manipulation ou de manipulations différentes d'une série ELISA.

II-5- Analyses statistiques des résultats

Tous les tableaux ont été construits avec le logiciel Excel 2003 et les graphes avec le logiciel GraphPad-Prism version 5 qui, avec le logiciel R version 2.10.1, a permis de faire les calculs et les analyses statistiques des résultats.

La première étape était l'enregistrement des résultats bruts de DO sur le logiciel Excel 2003, la vérification et le nettoyage des fichiers enregistrés. La seconde étape était de déterminer sur GraphPad-Prism la normalité ou pas des échantillons par le test T d'Adostino et Pearson. La majorité des échantillons de nos études n'ayant pas une distribution normale de Gauss, les tests non paramétriques ont été exclusivement utilisés pour les analyses statistiques. Ainsi, les comparaisons entre les médianes de 2 groupes différents (variables quantitatives) ont été effectuées par le test non paramétrique de Mann-Whitney s'ils sont indépendants ou par le test pair non paramétrique de Wilcoxon en cas d'appariement des deux groupes comparés. Pour les comparaisons entre proportions ou pourcentages de deux groupes différents (variables qualitatives), c'est le test F exact de Fischer qui a été utilisé. Les comparaisons entre médianes de plusieurs groupes ont été effectuées par les tests non paramétriques de Kruskal-Walis (pour séries indépendantes) ou de Fiedman (pour les séries appariées). Nous avons aussi utilisé le test non paramétrique de Spearman pour étudier la

corrélation entre deux variables quantitatives et une régression linéaire simple pour expliquer les variations des valeurs d'une variable X par celles d'une autre variable Y.

Enfin, un modèle linéaire mixte (tenant compte des effets fixes et dynamiques de chaque variable) construit grâce à la commande « lme » du logiciel R nous a permis d'estimer l'effet d'une variable (analyse univariée) et/ou de plusieurs variables à la fois (analyse multivariée) sur la réponse Ac. IgG sur la réponse Ac anti-protéines salivaires des populations de la région de Dakar.

Modèle linéaire mixte :

Le but de notre analyse est de dégager des facteurs pouvant expliquer la variabilité spatio-temporelle de la réponse (IgG) qui est une variable quantitative continue.

On reconnaît une structure des données dans laquelle l'effet 'ménage' est hiérarchisé au facteur 'quartier'. Cette hiérarchie introduit une corrélation possible entre les mesures faites dans différents ménages d'un même quartier ; ce qui exclut l'hypothèse d'indépendance des observations. Les modèles mixtes qui comportent à la fois des effets fixes et des effets aléatoires permettent de tenir compte de cette réalité.

On peut considérer (en observant les données) que les prélèvements dans les différents ménages au sein d'un même quartier ont été effectués dans la même période. D'un quartier à l'autre ces prélèvements ont été répétés mais à une autre période.

Nous avons donc choisi de prendre en compte le niveau 'ménage' à travers ses différentes caractéristiques que nous introduisons dans le modèle comme 'effets fixes'. Le niveau 'quartier' intervient dans le modèle en effet aléatoire.

Précisément, nous avons construit un modèle linéaire mixte avec intercept (constante) aléatoire au niveau 'quartier'. Il s'écrit comme suit :

$$E[Y_{ij}|q_i] = \beta_0 + \sum_{k=1}^{m} X_{ijk}\,\beta_k + q_i$$

Avec, X_{ij1} … X_{ijm}, variables explicatives du ménage j du quartier i.

β_1 … β_m, coefficients associés aux variables explicatives (effets fixes). β_0 constante.

q_i, effet aléatoire du facteur quartier ; supposée suivre une loi normale de moyenne nulle et de variance γ_q^2, qui est la variance inter-quartier.

$E[Y_{ij}|q_i]$, l'espérance (valeur moyenne) en terme de réponse IgG dans le quartier i.

$Y_{ij}|q_i$, la réponse IgG du ménage j sachant que la réponse IgG soit supposée suivre une loi normale dans chaque quartier i.

CHAPITRE VII

VERS UN INDICATEUR IMMUNO-EPIDEMIOLOGIQUE EVALUANT L'EFFICACITE DES DE LA LUTTE ANTI-VECTORIELLE (LAV)

VII-1- Validation du concept « salive totale » = marqueur d'exposition et outil d'efficacité LAV

Article 1: **Drame PM**, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J, Sow C, Dos-Santos MA, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. **2010**. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy of Insecticides Treated Nets in Malaria Vector Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 83 (1): 115-121.

L'étude de la réponse Ac anti-salive totale (extraits totaux) a été décrite comme un indicateur permettant d'évaluer l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae*, d'*An. dirus* et *An. darlingi,* d'estimer l'intensité de l'infection par *P. falciparum* et *P. vivax* et de prédire la symptomatologie du paludisme et le risque morbidité palustre dans des zones d'endémicité différentes (Andrade *et al.*, 2009; Remoue *et al.*, 2006; Waitayakul *et al.*, 2006). Dans l'objectif de développer un nouvel indicateur ou outil évaluant ou mesurant l'efficacité des stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme, nous avons orienté nos recherches vers l'étude de la réponse Ac dirigée spécifiquement contre la salive totale d'*An. gambiae* chez des individus exposés aux piqûres de ce vecteur, avant et après utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticides (MIIs) (voir **VI-1-2**). Ces données immunologiques (réponses Ac anti-salive) ont été comparées aux données entomologiques (densités anophéliennes) et parasitologiques (prévalences et densités des infections à *P. falciparum*) recueillies chez ces individus, pendant toute la durée de l'étude, afin de mettre en exergue de possibles corrélations entre ces différents outils épidémiologiques d'évaluation de la LAV.

VII-1-1- Suivis entomologique et parasitologique

Au cours de cette étude, 33 séances de piégeage (198 pièges lumineux de type CDC) ont été effectuées par l'équipe de l'OCEAC (coordonnée par J-C Toto) dans 6 habitations-témoins. L'analyse de ces données entomologiques nous a permis de faire une brève description de la situation générale de la faune culicidienne et d'évaluer l'abondance relative des différentes espèces de culicidés dans la zone d'étude (**Tableau 3**).

Au total 3132 moustiques culicidés ont été capturés, soit en moyenne 15,82 moustiques/ piège/ nuit. L'analyse par espèces et par genres de cette faune montre que :

- la population culicidienne est composée d'environ 9% d'*Anopheles*, 75% de *Culex,* moins de 1% d'*Aedes* et 16% d'autres genres de moustiques tels que les *Mansonia.* Ceci semble être normal étant donné le contexte urbain voire péri-urbain de l'étude ; le fait que le genre *Aedes* soit peu représenté est normal puisqu'il s'agit d'un moustique essentiellement diurne et les

captures étaient nocturnes et ne permettaient pas, de ce fait, d'évaluer son abondance réelle dans la zone.

- toutes les espèces d'anophèles capturées appartenaient au complexe *An. gambiae s. l.* Elles étaient des *An. gambiae* s.s. en majorité avec les deux formes moléculaires S (82%) et M (18%) et des *An. melas*. Cette différence de fréquence de ces deux formes moléculaires suggèrait une bio-écologie plus favorable à la forme S dans cette zone.

- le nombre moyen de moustiques par piège et par nuit est de l'ordre de 16, dont presque 12 de C*ulex*. Ceci indique l'importance du problème culicidien (nuisances) dans la zone étudiée.

Tableau 3 : Situation générale de la faune culicidienne dans les habitations étudiées

Moustiques capturés	Nombre (cumulé)	Nombre/piège/nuit	Abondance relative (%)
An. gambiae s.l.	**284**	**1,43**	**9,04%**
Aedes	14	0,07	0,44%
Culex	2337	11,80	74,59
Autres (*Mansonia* …)	499	2,52	15,93
Total	3132	15,82	100%

Cependant pour les besoins de cette étude, nous ne nous sommes intéressés qu'à la faune anophélienne, plus précisément aux membres du complexe *An. gambiae*, principaux vecteurs du paludisme dans cette zone. De ce fait, nous avons repris les résultats des différentes captures et calculé l'abondance d'*An. gambie s. l.* pour chaque enquête (densités exprimées en nombre de spécimens d'*An. gambiae* /piège/nuit), avant comme après mise en place des MIIs en février 2006 (**Figure 46**).

Un suivi parasitologique mené par l'équipe MCP de la clinique SONAMET de Lobito a permis de diagnostiquer les infections plasmodiales et d'évaluer l'évolution et l'effet des MIIs sur la parasitémie (prévalence et densités parasitaires). En effet, au cours de 14 enquêtes, un total de 3047 gouttes épaisses (GE) a été réalisé chez 230 individus. Leur lecture au microscope a révélé la seule présence de *P. falciparum* (ni *P. vivax* ni *P. ovale* n'ont été retrouvées) dans 144 prélèvements, soit une prévalence moyenne de 4,73%. La région peut être ainsi considérée comme étant hypo-endémique, ce qui n'est pas surprenant vu son caractère côtier. Les évolutions des prévalences parasitaires (A) et des densités parasitaires (B), donc de la parasitémie, dans la population totale (n =230, en trait continu rouge foncé) et dans l'échantillon « immunologique » (n=109, en trait rouge claire pointillé) ont été aussi

comparées aux résultats du suivi entomologique (densités d'*An. gambiae*, en trait vert plein) (**Figure 46**). La prévalence parasitaire moyenne est exprimée en pourcentage d'indice plasmodique (% IP) (**Figure 46A**) et les densités parasitaires moyennes (moyennes géométriques) en nombre de parasites (*P. falciparum*)/µl de sang (**Figure 46B**). La moyenne géométrique des densités parasitaires a été calculée pour chaque passage en incluant toutes les valeurs individuelles des GE, aussi bien les positives que les négatives. Pour cela, nous avons ajouté +1 à la valeur individuelle obtenue par lecture des GE, puis nous avons calculé le logarithme (log 10) de cette nouvelle valeur (nombre parasites/ µL de sang + 1.

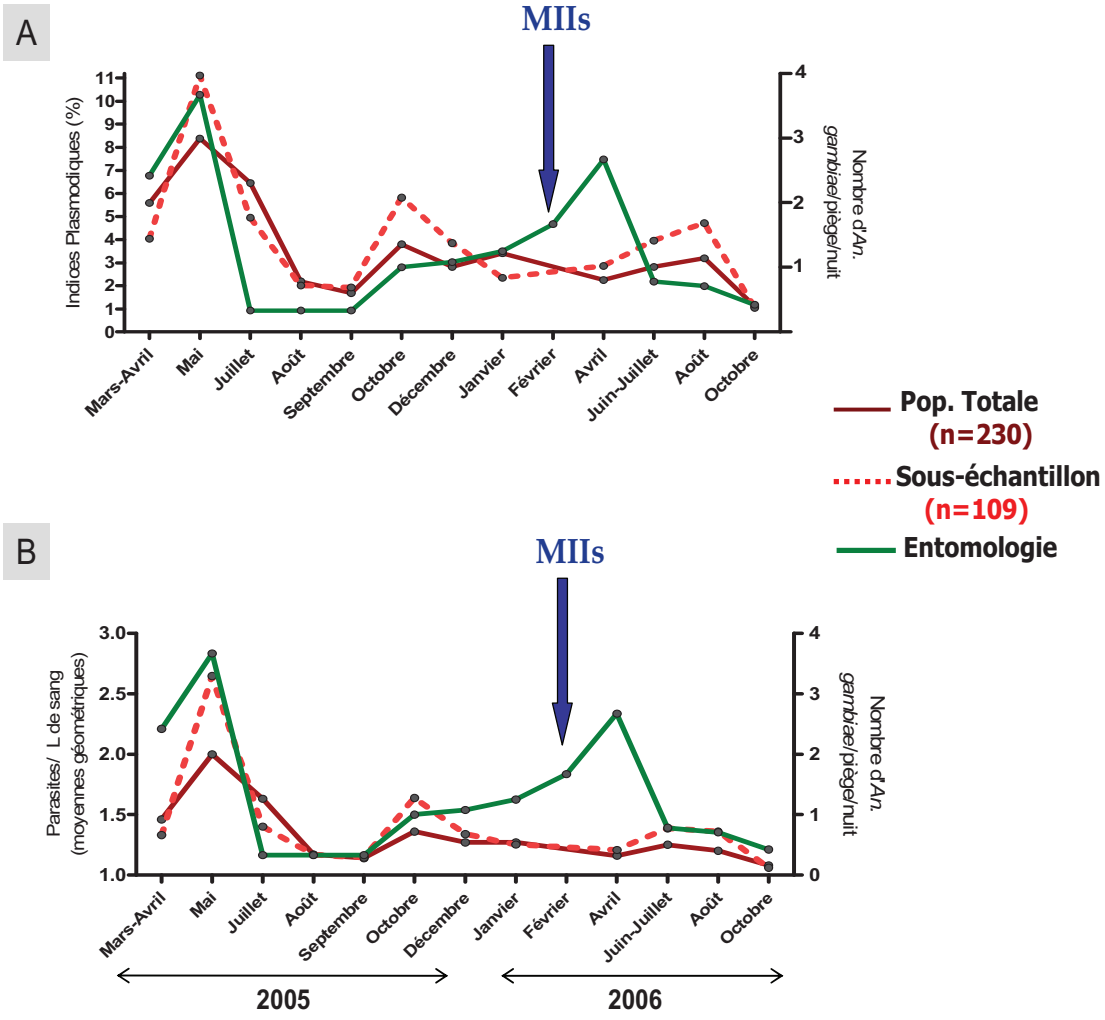


Figure 46 : Evolution de la parasitémie et des données entomologiques. Les évolutions de la prévalence **(A)** et des densités des infections à *P. falciparum* **(B)** sont comparées entre la population totale (trait rouge plein) et l'échantillon « immunologique » (trait rouge pointillé) et avec celle des densités moyennes d'*An. gambiae s.l.* (trait vert plein).

Ces graphes montrent que les évolutions de la prévalence et densités parasitaires moyennes dans la population totale (n= 230) et dans l'échantillon «immunologique» (n=109)

n'étaient pas significativement différentes, avant comme après la mise en place des MIIs. Ceci suggérait que l'échantillon « immunologique » était représentatif de la population totale. Par conséquent, seuls les résultats parasitologiques concernant le sous-échantillon ont été utilisés dans les comparaisons IgG anti-salive et parasitémie effectuées.

Les graphes de cette figure 46 montrent d'importantes variations de la parasitémie et des densités anophéliennes, avant comme après l'installation des MIIs. En effet, en 2005 (avant MIIs), une parasitémie maximale a été observée en mai (prévalence de 11% et densité de 2,65 *P. falciparum*/µl de sang). Puis elle avait baissé fortement en juillet et s'était maintenue à un niveau très bas pour le reste de l'année sauf en octobre où un léger rebond a été noté. Cette évolution de la parasitémie était assez bien corrélée à celle des densités moyennes d'*An. gambiae* qui montraient un pic en mai (3,8 *An. gambiae*/ piège/ nuit), juste après les fortes pluies de mars-avril, coïncidant avec le pic de parasitémie. De plus, une augmentation de la densité moyenne d'*An. gambiae*, en concordance avec la légère hausse de la parasitémie, a été observée en octobre 2005.

En 2006, après la mise en place des MIIs en février, les niveaux de parasitémie étaient devenus très bas (comparés à ceux de 2005) si bien que le pic saisonnier de mai 2005 avait disparu en avril 2006 et une réduction de 40% et 37% de la prévalence et de la densité parasitaire moyennes, respectivement, a été notée en avril 2006 (comparé à mars-avril ou à mai 2005). Mais, malgré cette chute des niveaux de parasitémie après la mise en place des MIIs, une différence significative d'intensité des infections à *P. falciparum* n'a pas été noté entre 2005 et 2006 (P = 0,33 entre mars/avril 2005 et avril 2006 ; P = 0,07 entre mai 2005 et avril 2006). Toutefois, cette chute non significative de la parasitémie était accompagnée de l'augmentation et de la persistance du pic saisonnier d'avril/mai des densités anophéliennes. D'ailleurs l'évolution de ces dernières était presque similaire en 2005 et 2006 malgré la présence des MIIs.

En résumé, ces résultats indiquent que la mise en place des MIIs était efficace sur la réduction de la parasitémie (prévalence et densités des infections à *P. falciparum*) et pas sur celle des densités anophéliennes.

VII-1-2- Résultats des enquêtes d'observance sur l'utilisation et la qualité des MIIs

Après la mise en place des MIIs en février 2006, 2 enquêtes transversales ont été menées, en avril (= enquête 1: pic saisonnier de l'exposition) et en fin juin-début juillet 2006 (=

enquête 2 : en début de saison sèche). Ces enquêtes ont permis d'évaluer les taux de perte, d'installation et de la correcte utilisation (installées en bon état ou pas) des moustiquaires par les populations, grâce à une série de questionnaires remplie par les enquêteurs. Les résultats obtenus lors de ces enquêtes sont représentés dans le **tableau 4.**

Tableau 4 : Résultats des enquêtes d'observance de la qualité et de l'utilisation des MIIs

Variables	Enquête 1 (10-25 avril 2006)	Enquête 2 (26 juin - 12 juillet 2006)	P (Fischer test)
	n = 130		
Durée des MIIs (en mois)	2	4	
MIIs trouvées	102	95	
MIIs perdues	28	35	
Taux de perte	21,5%	26,9%	0,38
MIIs installées	**100/102 (98,0%)**	**82/95 (86,3%)**	**0,002**
MIIs installées en bon état	**93/102 (91,7%)**	**69/95 (72,6%)**	**0,0007**
MIIs installées en mauvais état (trouées, abimées,..) ou mal utilisées	7/100 (7,0%)	13/82 (15,8%)	0,06

Ainsi, un total de 130 MIIs a été distribué aux 230 membres de ces 21 familles. Le taux de perte des MIIs de 21,5% en avril (2 mois après leur distribution) avait augmenté de façon non significative (*P=0,38* ; test exact de Fischer) jusqu'à 26,9% en juin-juillet (4-5 mois après). Ceci était accompagné d'une diminution significative (*P=0,002* entre avril et juin-juillet; test exact de Fischer) du nombre de moustiquaires installées (en bon ou mauvais état), donc du taux d'utilisation de 98,0% en avril à 86,3% en juin-juillet. Le taux de MIIs utilisées en correct état (ni trouées, ni abîmées, ni délabrées,…) avait aussi très significativement baissé (*P=0,0007;* test exact de Fischer) d'avril (91,7% : 93/102) à juin-juillet (72,6% : 69/95). Ce résultat est expliqué à la fois par une baisse du taux d'installation des MIIs et une augmentation du taux de MIIs endommagées (troués, abîmées, délabrées,…) ; mais surtout par la baisse du taux d'installation puisque l'augmentation d'avril à juin-juillet du taux de MIIs endommagées n'était pas significative (*P=0,06 ;* test exact de Fischer).

En résumé, ces résultats ont rapporté que 4-5 mois après leur distribution, seules 63% (82/130) des MIIs étaient installées et 53% (69/130) seulement étaient correctement utilisées et en bon état (non endommagées : ni trouées, abîmées, déchirées ou délabrées).

VII-1-3- Evaluation de la réponse IgG anti-salive avant et après utilisation des MIIs

Nous avons évalué la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae* chez les 109 individus (enfants et adultes) du sous-échantillon « immunologique », avant et après utilisation des MIIs. Les résultats sont exprimés en médiane du niveau d'IgG spécifiques par passage (par enquête de prélèvement) (trait plein bleu) et comparés à ceux de la parasitémie (densité parasitaire moyenne ; trait pointillé rouge) calculés chez ces mêmes individus pour chaque passage (**Figure 47**).

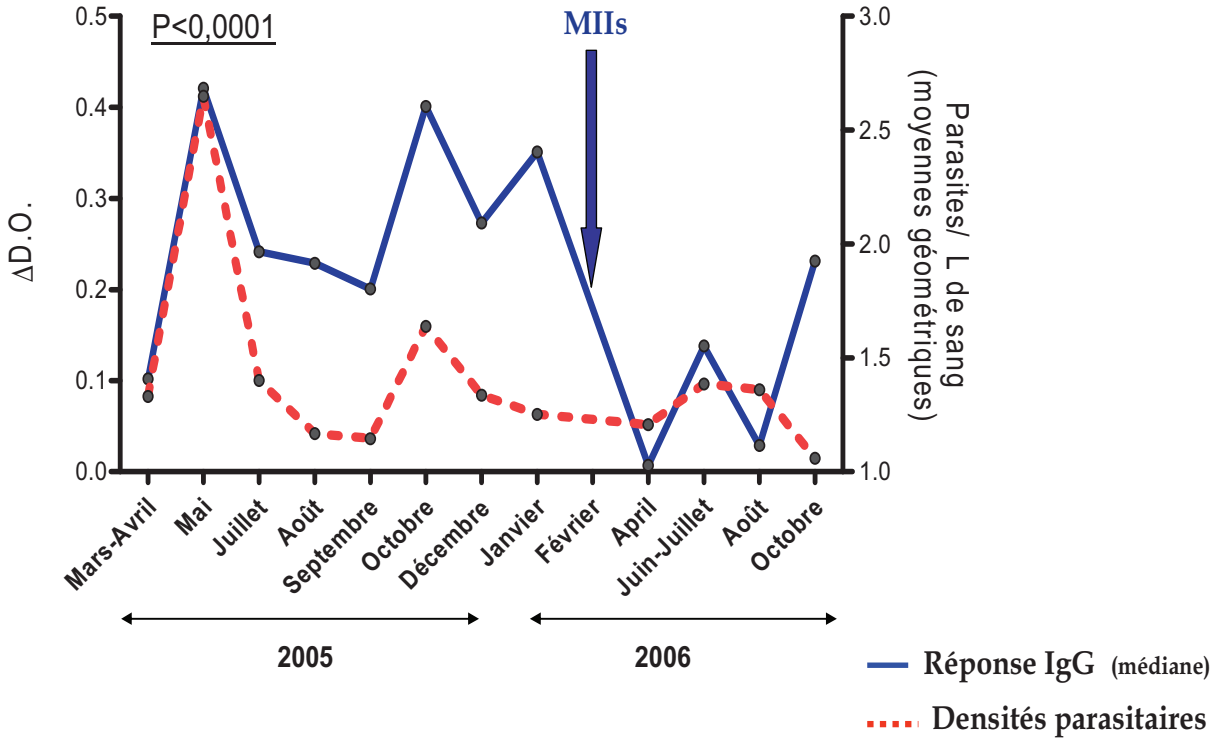


Figure 47: Réponse IgG anti-salive avant et après utilisation des MIIs et parasitémie.

Comme observé pour la parasitémie, les niveaux médians d'IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* ont montré de considérables variations saisonnières en 2005, avant la mise en place des MIIs (*P<0,0001* ; test non paramétrique de Kruskal-Wallis). En effet, un 1er pic observé en fin de saison des pluies (en mai) coïncidait avec ceux de l'intensité des

infections à *P. falciparum* (parasitémie) et de la densité moyenne d'*An. gambiae* (pic d'exposition aux piqûres). Après une baisse des niveaux d'IgG anti-salive de juillet à septembre, en concordance avec les faibles parasitémies enregistrées durant cette période, un 2nd pic (moins important que le 1er de mai) a été observé en octobre. Ce « petit » d'octobre était associé au rebond noté en termes de parasitémie observé précédemment.

Comme pour la parasitémie, les niveaux de réponse Ac IgG anti-salive étaient beaucoup plus faibles en 2006 qu'en 2005 ; les mois de 2006 sont comparés à leurs correspondants de 2005. En particulier, les niveaux d'IgG spécifiques deviennent très faibles d'avril à août 2006 comparé aux mois de la même période en 2005. De façon intéressante, le pic d'IgG spécifiques d'avril/mai 2005 disparaît complètement en avril 2006, juste 2 mois après la mise en place des MIIs. En effet, le niveau d'IgG spécifiques est significativement plus bas en avril 2006 comparé à mars-avril (*P<0,001;* test non paramétrique de Mann-Whitney) et à mai 2005 (*P<0,0001*). Cet effet était accompagné d'une baisse de la parasitémie ; même si elle n'était pas significative. Cependant, une augmentation significative des niveaux d'IgG spécifiques a été observée en juin-juillet et en octobre (4-5 et 8 mois, respectivement, après l'utilisation des MIIs) comparés aux autres mois post-MIIs (avril et août 2006). Même s'ils restaient significativement plus bas que leurs correspondants de 2005 (*P= 0,01* pour juin-juillet ; *P<0,001* pour octobre). Ce résultat coïncidait avec la baisse significative du taux d'utilisation des MIIs en bon état décrite précédemment (seules 53% des MIIs étaient utilisées et en bon état en juin-juillet 2006).

Pour compléter l'analyse faite au niveau « population » (niveau collectif), les résultats des réponses IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* ont été aussi analysés au niveau « individuel », avant comme après la mise en place des MIIs. Les résultats issus de cette analyse ne sont présentés que pour les mois (ou passages) ayant des correspondants entre 2005 et 2006 : avril/mai, juillet, août et octobre (**Figure 48)**. Les prélèvements coïncidant avec le pic de transmission ont été faits du 10 au 22 avril en 2006 et de fin mars- début avril (26 mars- 12 avril) et du milieu à la fin du mois de mai en 2005. D'où notre décision de comparer les IgG individuels spécifiques d'avril 2006 (après MIIs) à ceux de mars-avril d'une part et de mai 2005 d'autre part, mois correspondants avant MIIs. En 2006, les prélèvements de juin-juillet ont été faits du 26 juin au 12 juillet, d'où notre décision de considérer juin-juillet comme juillet « tout court ».

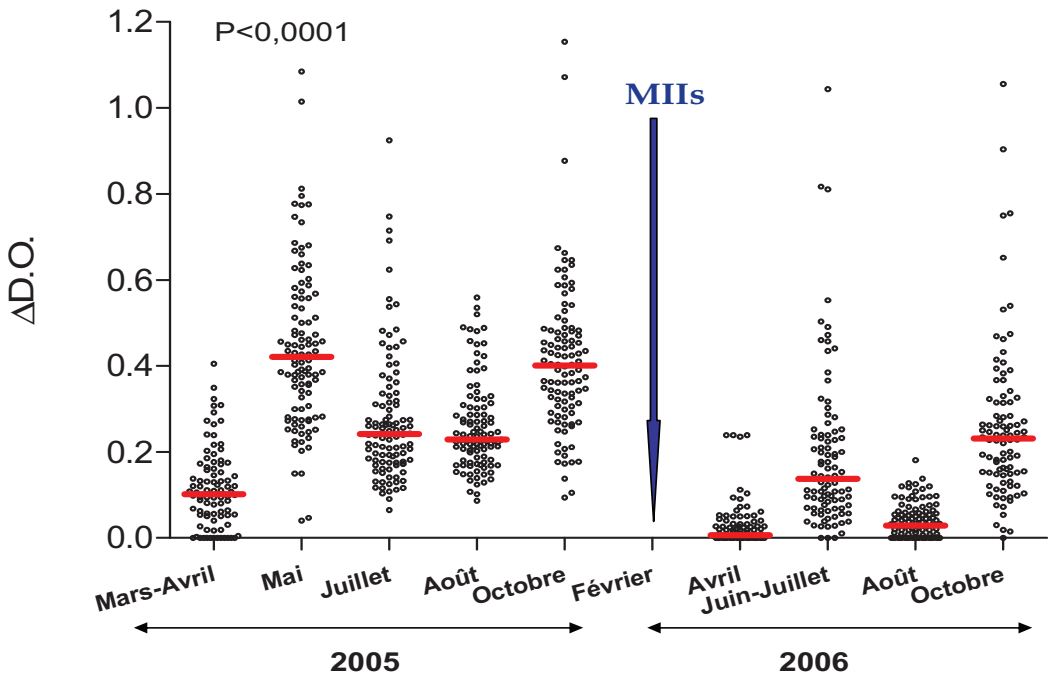


Figure 48 : Niveaux individuels de réponse Ac IgG anti-salive totale avant et après utilisation des MIIs

Malgré les fortes variations intra-individuelles observées, les réponses IgG anti-salive totale d'*An. gambiae* ont clairement et fortement baissé chez une grande majorité des individus après la mise en place des MIIs. En effet, les réponses IgG individuelles étaient significativement plus faibles en 2006 comparé à 2005 pour les mois d'avril (*P<0,001* comparé à mars-avril 2005 et *P<0,0001* comparé à mai 2005 ; test pair non paramétrique de Wilcoxon), juillet (*P<0,01*), août (*P<0,001*) et octobre (*P<0,001*). Ces résultats montrent donc que la baisse des niveaux d'IgG était significativement plus marquée en avril 2006 (2 mois juste après distribution des MIIs). Pendant cette période, les taux d'installation et de la correcte utilisation des MIIs étaient respectivement 98,0% et 91,7%. En revanche, en juillet (4 mois après leur distribution) par exemple, ils étaient significativement plus bas et de 86,3% et de 72,6% respectivement. L'augmentation du niveau d'IgG spécifiques notée en octobre chez la plupart des individus peut donc être expliquée en partie par ce déficit d'installation et de correcte utilisation des MIIs.

VII-1-4- Variations de la réponse IgG anti-salive en fonction de l'âge et du sexe

Une attention particulière a été faite à certains facteurs épidémiologiques de variation de la réponse immune adaptative tels que l'âge et le sexe des individus afin d'évaluer s'ils jouaient un rôle dans l'évolution la réponse IgG spécifique à la salive totale *d'An. gambiae*.

VII-1-4-1- Evolution de la réponse IgG anti-salive en fonction de l'âge des individus

Pour rechercher un possible effet « âge », le sous-échantillon a été subdivisé en 3 classes d'âge : 0-6 ans (n = 49), 7-14 ans (n = 34) et > 14 ans (n = 25). L'évolution des niveaux médians de réponses IgG spécifiques en fonction de l'âge est représentée dans la **figure 49**.

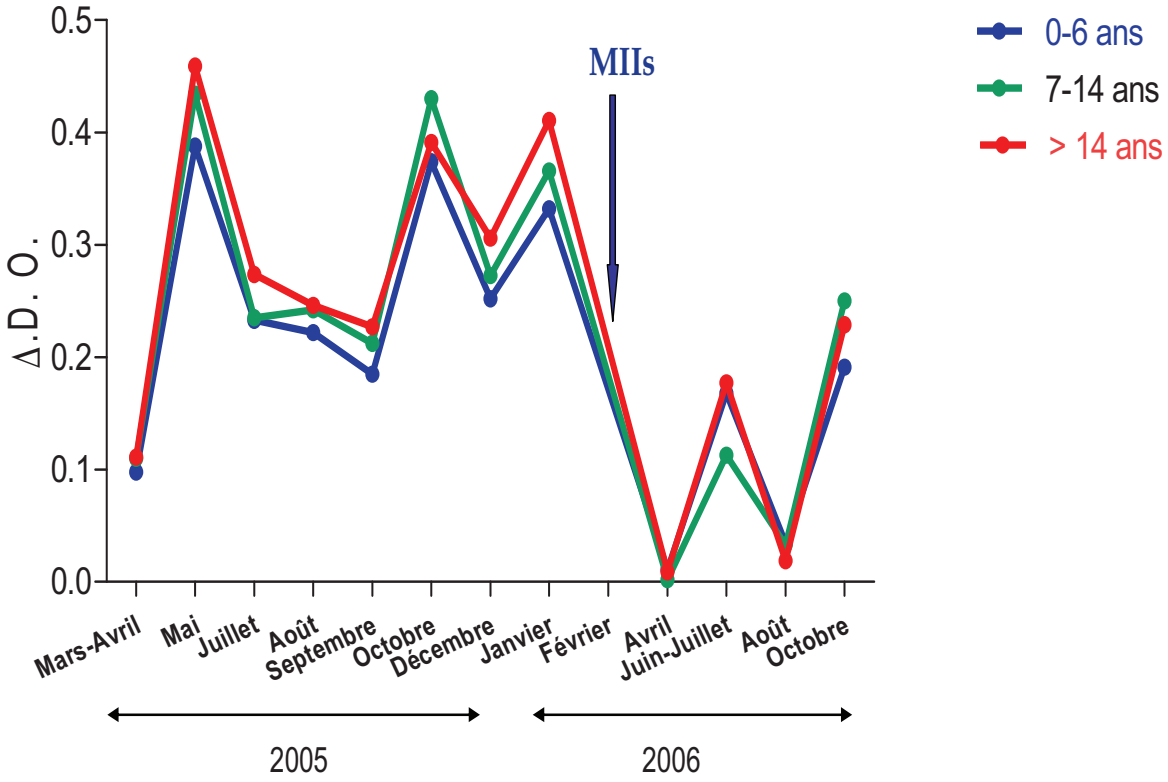


Figure 49 : Evolution des réponses IgG anti-salive en fonction de l'âge

Ce graphe montre que l'évolution des réponses IgG spécifiques, avant comme après mise en place des MIIs, était similaire dans les trois classes d'âge et identique à celle observée dans la population totale (adultes et enfants réunis). Ceci suggérait l'absence d'un effet « âge » sur la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*An. gambiae*. La chute importante des niveaux de réponses IgG médians et individuels après l'utilisation des moustiquaires était donc similaire dans les 3 classes d'âge.

VII-1-4-2- Evolution de la réponse IgG anti-salive en fonction du sexe des individus

Pour l'effet « sexe », nous avons comparé le profile des réponses IgG individuelles des sujets de sexe masculin (n = 42 ; 38,5%) à ceux de sexe féminin (n = 67 ; 61,5%), tous les âges confondus.

Comme pour l'âge, l'évolution des niveaux médians d'IgG spécifiques entre les hommes et les femmes était similaire, avant comme après mise en place des MIIs. Ceci suggèrait que le sexe des individus n'affecte pas la réponse IgG anti-salive et que la baisse observée des niveaux d'IgG spécifiques était similaire dans le groupe des « hommes » et dans celui des « femmes ».

En résumé, dans cette étude, le sexe et surtout l'âge, facteurs majeurs de variations de la réponse immune adaptative, n'ont pas d'effet significatif sur le développement de la réponse Ac (IgG) dirigée spécifiquement à la salive totale d'*An. gambiae*, principal vecteur de *P. falciparum*, la seule espèce plasmodiale diagnostiquée au moment de l'étude dans cette zone. La chute du niveau d'IgG spécifiques à la salive d'*An. gambiae* après la mise en place des MIIs semble donc être indépendante de l'âge et du sexe des individus exposés.

VII-1-5- Réponse IgG anti-salive selon le statut infectieux des individus

Nous avons aussi regardé si les individus infectés par *P. falciparum* (seule espèce plasmodiale diagnostiquée lors de cette étude) présentaient des profiles ou niveaux de réponse IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* différents. Pour ceci, nous avons pris les prélèvements du mois de mai 2005 (pic de la transmission) où la plus forte parasitémie (densités et prévalences parasitaires les plus élevées) et les densités anophéliennes les plus élevées ont été enregistrées, puis comparé les niveaux d'IgG spécifiques entre les individus non infectés (n= 94) et les individus infectés par *P. falciparum* (n= 14). Les résultats de cette comparaison sont présentés dans la **figure 50**.

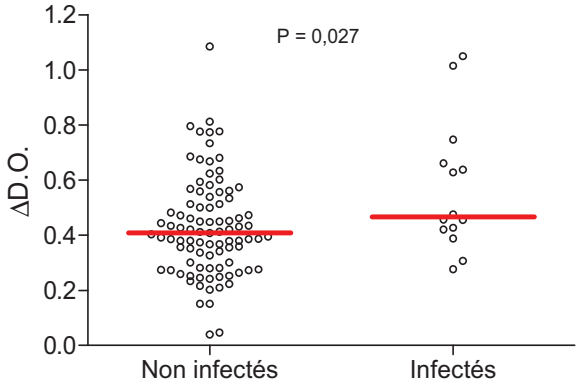


Figure 50 : Réponse IgG anti-salive totale chez les 109 individus infectés ou non (mois de mai = pic de transmission)

Ce graphe rapporte que le niveau médian d'IgG spécifiques à la salive totale d'*An. gambiae* étaient significativement plus faible chez les individus non infectés comparés à ceux qui étaient infectés par *P. falciparum* (*P= 0,027*; test non paramétrique de Mann-Whitney). De plus, les niveaux individuels d'IgG spécifiques des individus infectés étaient tous supérieurs à 0,2 (ΔDO (individuel) > 0,204 = SR); ce qui n'était pas le cas de ceux des non infectés chez lesquels quelques ΔDO (individuel) < 0,204 ont été observés. Ce résultat doit, toutefois, être interprété avec une grande retenue, vu le grand écart existant entre le nombre des infectés et celui des non infectés et la faiblesse de l'échantillon des infectés (n = 14).

VII-2- Le peptide gSG6-P1: le candidat bio-marqueur pour l'évaluation pertinente de l'efficacité de la LAV

Article 2: **Drame PM**, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J,, Sow C, Dos-Santos MA, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. 2010. Human antibody response to the Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: a novel tool for evaluating the efficacy of Insecticide Treated Nets in malaria vector control. *PlosONE* 5 (12) : e 15596.

Les résultats de la première partie de ce chapitre **(**voir **VII-1)** confirment le concept de la « réponse Ac anti-salive totale » comme biomarqueur de l'exposition et suggèrent même qu'elle pourrait être un indicateur d'efficacité de l'utilisation des MIIs en particulier, et des stratégies de lutte anti-vectorielle en générale. Cependant, la pertinence d'un tel outil serait discutable en raison d'un problème de spécificité des composantes de la salive totale d'*Anopheles,* notamment, et de la production de la salive en quantité suffisamment utilisable pour les études à large échelle. Les résultats entomologiques, présentés précédemment dans ce chapitre, ont montré que les individus de cette zone étaient aussi exposés aux piqûres (infectantes et non infectantes) de moustiques autres que *Anopheles* : des *Culex* surtout, des *Mansonia* et des *Aedes*. Une partie de la réponse IgG supposée être spécifique à la salive d'*Anopheles* pourrait donc être due à des antigènes salivaires d'autres vecteurs comme ces *Culex*, *Mansonia* ou *Aedes* ou à des épitopes d'autres organismes vivants. En effet, la salive totale est constituée d'un panel de molécules de nature et fonctions biochimiques différentes. Certaines de ces molécules sont spécifiques à l'espèce, le genre ou la famille alors que d'autres peuvent être communes à plusieurs espèces, genres, familles, classes voire embranchements apparentés d'arthropodes ou d'animaux (de façon générale) (Francischetti *et al.*, 2009; Ribeiro, 1995). Chez les moustiques en particulier, des réponses IgG4 et IgE pouvaient être dirigées contre des protéines salivaires spécifiques à une espèce ou un genre ou communes à différents genres ou espèces de moustiques (Brummer-Korvenkontio *et al.*,

1997a; Jeon *et al.*, 2001). Cependant, de récents travaux ont montré que cette réaction immunologique croisée semblait être très faible ou inexistante (Remoue *et al.*, 2006; Waitayakul *et al.*, 2006). De plus, les techniques de récolte de la salive totale des moustiques, salivation par capillarité (voir **« VI-4-1-1 »**) ou extraction des glandes salivaires, nécessitent une logistique biologique assez conséquente et sont difficilement applicables aux études épidémiologiques sur le terrain (études LAV de phase 3, notamment). Cette 2nde partie du chapitre a pour objectif principal de valider le peptide gSG6-P1, peptide antigénique, spécifique à *Anopheles* et synthétisé chimiquement, comme cet outil/indicateur d'évaluation épidémiologique de l'efficacité des MIIs et de la LAV, afin de contourner ces possibles problèmes de cross-réactivité, de production et de reproductibilité. Comme pour la salive totale, les données immunologiques issues des dosages avec le gSG6-P1 (réponses Ac anti-gSG6-P1) ont été comparées aux données entomologiques (densités anophéliennes) et à la parasitémie (intensité des infections à *P. falciparum*) recueillies chez ces individus, pendant toute la durée de l'étude, dans le but de mettre en évidence de possibles corrélations entre ces différents outils épidémiologiques d'évaluation de la LAV.

VII-2-1- Réponses IgG anti-peptide gSG6-P1 avant et après utilisation des MIIs

Nous avons évalué la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez 105 individus (enfants et adultes) du sous-échantillon « immunologique » dont les prélèvements sur papiers buvards étaient disponibles pour au moins 12 des 14 passages que comptait l'étude.

VII-2-1-1- Détermination et évolution de la proportion d'individus répondeurs

Pour chacun de ces 14 passages, nous avons identifié les individus répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 et calculé le pourcentage de répondeurs (% IR)

Le **tableau 5** résume le nombre et le pourcentage de répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 en tenant compte du taux de pertes pour chacune des 14 enquêtes de l'étude.

Tableau 5: Nombre et pourcentage de répondeurs des 105 individus suivant les mois

Passages (prélèvements)	Individus prélevés	Individus absents (%)	Répondeurs (%)
Mars/avril 05	95	10 (9,52%)	72 (75,78%)
Mai 05	103	2 (1,90%)	81 (78,64%)
Juillet 05	101	4 (3,81%)	77 (76,23%)
Août 05	100	5 (4,76%)	69 (69,00%)
Septembre 05	101	4 (3,81%)	78 (77,23%)
Octobre 05	99	6 (5,71%)	71 (71,71%)
Décembre 05	102	3 (2,86)	66 (64,71%)
Janvier 06	100	5 (4,76%)	64 (64,00%)
Mise en place des MIIs (février 2006)			
Avril 06	100	5 (4,76%)	5 (5,00%)
Juin/juillet 06	94	11 (10,48%)	16 (17,02%)
Août 06	101	4 (3,81%)	9 (8,91%)
Octobre 06	96	9 (8,57%)	30 (31,25%)
Décembre 06	85	20 (19,05%)	74 (87,06%)
Janvier 07	88	17 (16,19%)	76 (86,36%)

Avant la mise en place des MIIs (en 2005), la proportion de répondeurs variaient très peu en fonction de la saison, avec un maximum de 78,64% en fin de saison pluvieuse (en mai, après les fortes pluies de mars-avril), un minimum de 64,00% en janvier 2006 et des valeurs intermédiaires durant la saison sèche (76,23% en juillet, 69% en août et 77,23% en septembre). Ceci suggérait que la proportion d'individus répondeurs était presque similaire en saison pluvieuse et en saison sèche, malgré une différence d'intensité aux piqûres d'*Anopheles* entre ces 2 périodes. Cependant, 2 mois après l'installation des MIIs (en avril 2006), la proportion de répondeurs avait significativement baissé à 5,00% ($P<0,0001$; test F exact de Fischer). Cette faiblesse de la proportion de répondeurs s'était maintenue par la suite jusqu'en juillet (4-5 mois après MIIs) et août 2006 (6 mois après MIIs). Ceci suggérait l'efficacité des moustiquaires sur la réduction pourcentage de répondeurs en IgG spécifiques et donc sur la réduction du contact homme-vecteur. Cependant, à partir du mois d'octobre 2006 (8 mois après MIIs) le pourcentage de répondeurs en IgG spécifiques redevenait élevé pour atteindre ensuite des valeurs similaires à celles observées avant mise en place des MIIs en décembre 2006 et janvier 2007.

L'évolution de la proportion de répondeurs IgG anti-gSG6-P1, avant comme après l'installation des MIIs, a été comparée à celles des données entomologiques (densités anophéliennes moyennes) et de la parasitémie moyenne (densités parasitaires moyennes) (**Figure 51**) déjà décrites dans la partie « **VII-1-1 Suivis entomologique et parasitologique** ». Il n'y pas cependant eu de captures entomologiques durant les 2 derniers passages (décembre 2006 et janvier 2007).

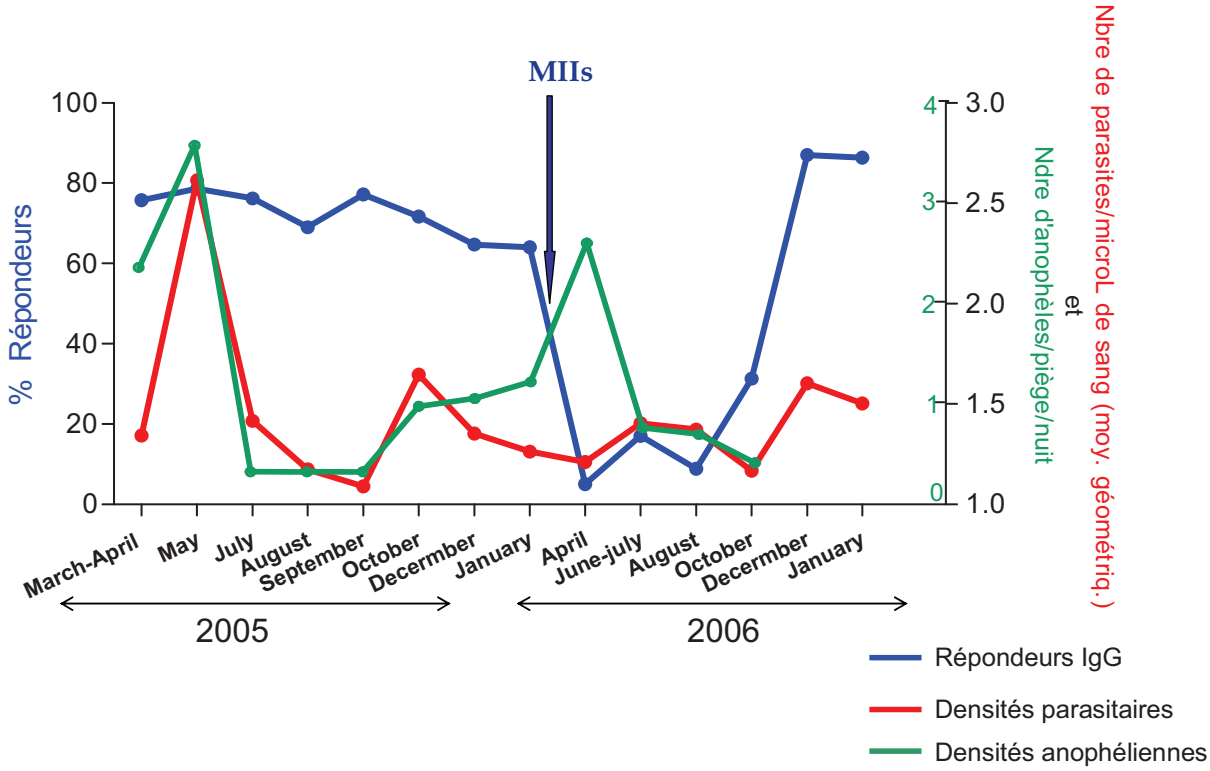


Figure 51 : Comparaisons entre le pourcentage de répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et les données entomologiques et parasitologiques

Comme cela a été précédemment décrit, avant la mise en place des MIIs, en 2005, la proportion de répondeurs apparaissait relativement constante en fonction des mois d'étude et ne montrait aucun pic significatif. Elle ne suivait donc pas les évolutions des densités moyennes d'*An. gambiae* et de la parasitémie moyenne qui avaient montré de significatifs pics saisonniers en mai et un légère augmentation (petit pic) en octobre.

La forte baisse de la proportion de répondeurs en IgG notée en avril 2006 était accompagnée de la chute de la parasitémie moyenne. Cependant la densité anophélienne moyenne augmentait jusqu'à 3 *An. gambiae*/ piège/ nuit presque et n'était donc pas significativement différente de celle obtenue en mai 2005 (3,8 *An. gambiae* / piège/ nuit). D'ailleurs, le pourcentage de répondeurs, comme la parasitémie et l'entomologie, était resté faible en juin-juillet (4-5 mois après MIIs) et en août (6 mois après MIIs). Puis, il avait

augmenté de nouveau à partir d'octobre (8 mois après MIIs) pour atteindre des valeurs identiques à celles d'avant moustiquaires en décembre (10 mois après MIIs) et en janvier (11 mois après MIIs). Ainsi, la chute significative du pourcentage de répondeurs a été notée que pour les 5 premiers mois post-MIIs.

VII-2-1-2- Réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles et évolution des réponses médianes

Les résultats des réponses IgG individuelles (points noirs) et médianes (barres rouges) spécifiques à gSG6-P1, avant et après la mise en place des MIIs, sont représentés (**Figure 52**).

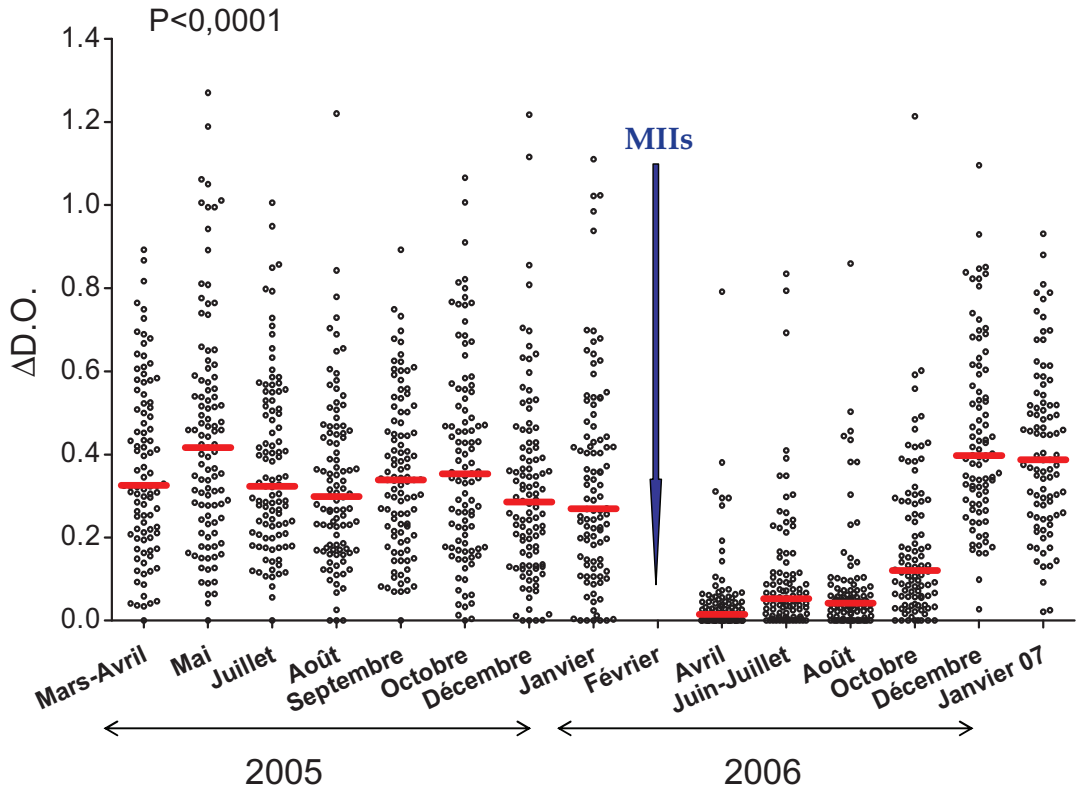


Figure 52 : Niveaux d'Ac IgG anti-gSG6-P1 avant et après utilisation des MIIs

Cette figure montre, pour chaque mois (passage) d'importantes variations des réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles. Malgré ces très fortes variations individuelles mensuelles, les niveaux médians d'IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 ont montré de considérables variations saisonnières en 2005 avant la mise en place des MIIs (*P<0,0001*) (**Figure 52**), contrairement au pourcentage de répondeurs en IgG spécifiques. En effet, un 1er pic du niveau d'IgG spécifiques a été observé en mai. Après une baisse des niveaux d'IgG anti-gSG6-P1 de juillet à septembre, un 2nd pic (moins important que le 1er de mai) a été observé en octobre. Ces variations du niveau d'IgG médian semblaient être en concordance avec celles de la

parasitémie (densités parasitaires moyennes) et de l'entomologie (densités moyennes d'*An. gambiae*).

Après la mise ne place des MIIs, les niveaux individuels de réponses IgG anti-gSG6-P1 ont fortement baissés chez une grande majorité des individus comme cela a été observé pour la proportion de répondeurs. D'ailleurs en 2006 (comparé à 2005), ces taux individuels de réponses étaient significativement plus faibles pour avril (*P<0,001* comparé à mars-avril et *P<0,0001* comparé à mai), juillet (*P<0,01*), août (*P<0,001*) et octobre (*P<0,001*). La chute des réponses IgG spécifiques (individuelles et médianes) la plus spectaculaire était notée en avril 2006 (juste 2 mois après MIIs). Ces réponses IgG spécifiques restaient par la suite faibles en juillet (5 mois après MIIs) et août 2006 (6 mois après MIIs), même si plus de répondeurs (> 0,204 de ΔDO) ont été observés pour ces 2 mois comparés à avril 2006. Puis, elles avaient augmenté de nouveau à partir d'octobre (8 mois après MIIs) pour atteindre des valeurs similaires à celles d'avant moustiquaires en décembre (10 mois après MIIs) et en janvier (11 mois après MIIs). Les résultats des enquêtes de suivi de la qualité et de l'utilisation des MIIs avaient montré que les taux de perte, d'installation et de la correcte utilisation des MIIs baissaient significativement d'avril 06 à juillet 2006, si bien que seules 53% des MIIs étant en bon état et correctement utilisées en juillet 2006. L'augmentation du niveau d'IgG spécifiques chez la plupart des individus notée à partir d'octobre peut donc être expliquée en partie par ce déficit d'installation et de correcte utilisation des MIIs, même si aucune enquête sur leur qualité ou leur utilisation n'a été menée pendant cette période. Toutefois, la forte chute des réponses IgG spécifiques (individuelles et médiane) observée de janvier (juste avant MIIs) à avril 2006 (juste après MIIs) montre que la réponse IgG anti-gSG6-P1 pourrait être un critère d'efficacité à court terme de l'utilisation des MIIs (voir chapitre **VII-2-1-3**).

VII-2-1-3 Réponses IgG anti-gSG6-P1 et évaluation à court terme de l'efficacité individuelle des MIIs

Pour évaluer l'efficacité de l'utilisation individuelle de la moustiquaire à court terme, nous avons comparé le niveau de réponse IgG en janvier (dernier prélèvement avant MIIs) et en avril 2006 (1er prélèvement après MIIs) de 100 individus (enfants et adultes) (**Figure 53A**) et calculer leur ΔDO_{MII} (**Figure 53B**) qui est défini par la différence de ΔDO entre avril et janvier 2008 : $\Delta DO_{MII} = \Delta DO_{avril\,06} - \Delta DO_{janvier\,06}$. Ceci nous a permis de mieux voir et estimer la baisse des réponses individuelles spécifiques au gSG6-P1 sous l'effet de l'utilisation de la MII.

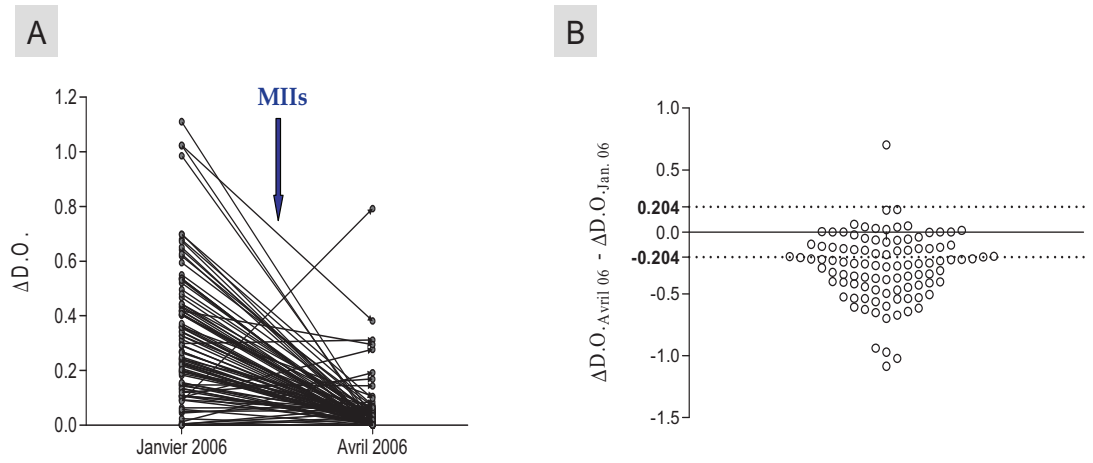


Figure 53 : Réponse IgG anti-gSG6-P1 pour évaluer l'efficacité à court terme de l'utilisation individuelle des MIIs

La médiane des réponses IgG anti-gSG6-P1 de ces 100 individus était significativement plus petite en avril (juste après MIIs) comparé à janvier (juste avant MIIs) (*P<0.0001* ; voir **Figure 52**). Cette baisse du niveau médian d'IgG spécifiques en avril est matérialisée par une chute des niveaux individuels de réponses IgG anti-gSG6-P1 chez la grande majorité de ces individus. En effet, les niveaux d'IgG spécifiques ont baissé chez tous les individus sauf chez 5 d'entre eux (**Figure 53A**). Et de façon plus précise, quand nous avons évalué le ΔDO_{MII} (= ΔDO_{avril} - $\Delta DO_{janvier}$) de ces 100 individus, nous avons noté que 60% avaient montré une baisse significative de réponse IgG spécifique ($\Delta DO_{MII} < -0,204 = -SR$), 39% n'avaient pas montré de changement significatif ($-0,204 < \Delta DO_{MII} < +0,204$) et seul 1% avait montré une augmentation significative de niveau de réponse IgG anti-gSG6-P1 ($\Delta DO_{MII} < +0,204 = SR$).

VII-2-2- Variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge et du sexe

Nous avons aussi analysé l'évolution de la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 en fonction de certains facteurs de variation de la réponse immune adaptative tels que l'âge et le sexe. Ceci nous permettait de savoir si la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 pouvait être un biomarqueur applicable comme indicateur d'efficacité de l'utilisation des MIIs quels que soient l'âge et le sexe.

VII-2-2-1- Effet de l'âge sur la réponse IgG anti-gSG6-P1

Pour évaluer l'effet de l'âge sur la réponse Ac IgG spécifique au peptide salivaire gSG6-P1, nous avons subdivisé notre échantillon en 3 classes d'âge : 0-6 ans (n = 47), 7-14 ans (n =

33) et >14 ans (n = 25) L'évolution des niveaux médians de réponses IgG spécifiques en fonction de l'âge est représentée dans la **figure 54**.

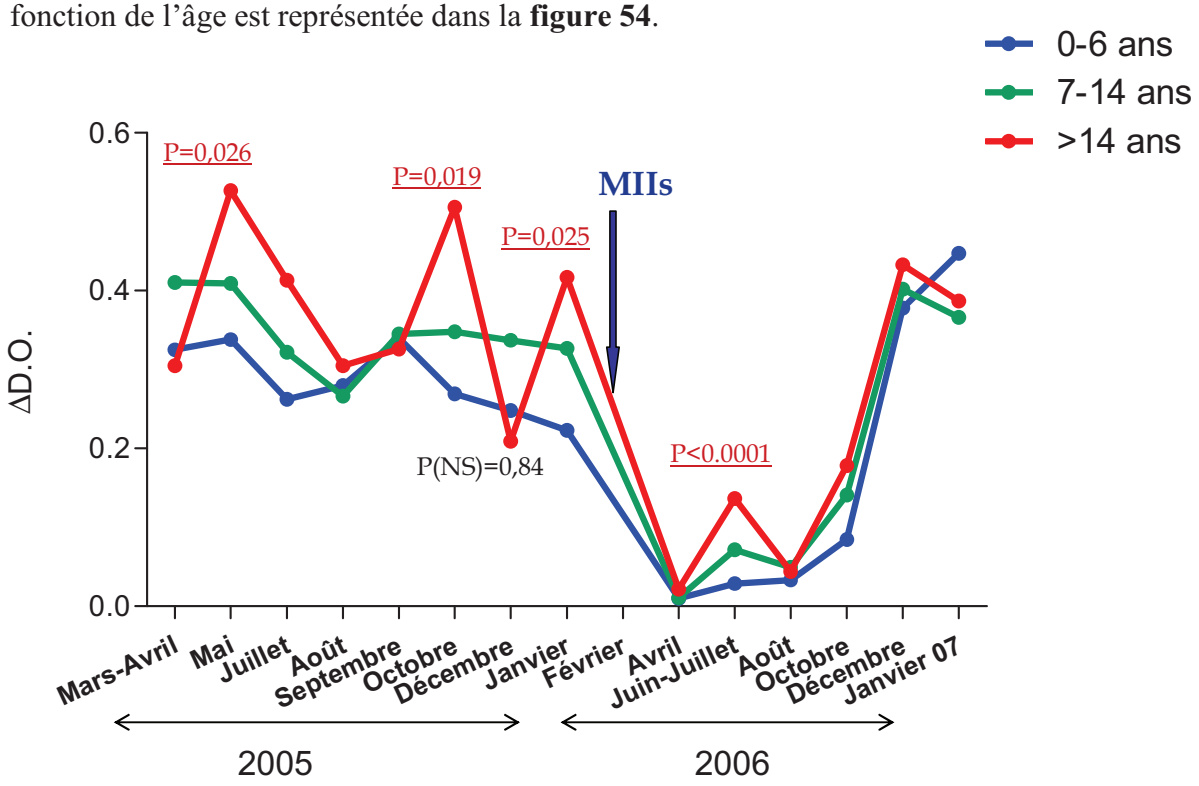


Figure 54 : Evolution des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge

De façon générale, ces résultats montrent que l'évolution des niveaux médians d'IgG spécifiques, avant comme après mise en place des MIIs, était relativement similaire dans les trois classes d'âge et identique à celle observée dans la population d'étude (adultes et enfants du sous-échantillon réunis). Cependant, des différences significatives de niveau de réponse IgG spécifique ont été notées pour certains mois (passages). En effet, les individus âgés de plus de 14 ans (adolescents et adultes) avaient significativement un niveau médian d'IgG spécifiques plus élevé que celui des jeunes enfants (0-6 ans) et des enfants de 7-14 ans en mai 2005 ($P = 0,026$; test non paramétrique de Kruskal-Wallis), en octobre 2005 ($P = 0,019$) en janvier 2006 ($P = 0,025$) et en juin-juillet 2006 ($P<0,0001$). De plus, avant la mise en place des MIIs (en 2005), les variations saisonnières des médianes mensuelles de réponse IgG étaient beaucoup plus marquées dans le groupe d'âge >14 ans comparé aux deux autres groupes. Cependant, la chute importante des niveaux médians de réponses IgG observée en avril 2006, après la mise en place des MIIs (février 2006), était similaire dans toutes les 3 classes d'âge.

Nous avons aussi approfondi notre étude sur l'effet de l'âge sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 comme indicateur évaluant l'efficacité à court terme de l'utilisation individuelle des

moustiquaires dans chaque tranche d'âge. Pour cela, nous avons suivi la réponse IgG anti-gSG6-P1 en janvier (juste avant MIIs) et en avril 2006 (juste après MIIs) chez les individus de chacune de ces tranches d'âge (**Figure 55) :** 0-6 ans (**figure 55A**), 7-14 ans (**Figure 55B**) et > 14 ans (**Figure 55C**)

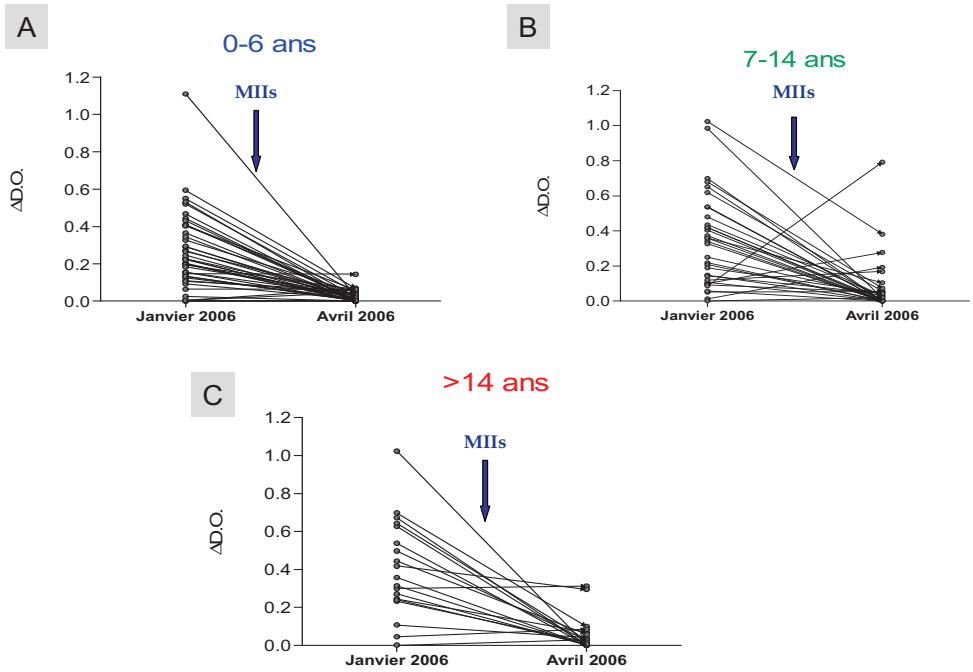


Figure 55 : Réponses IgG anti-gSG6-P1 pour évaluer l'efficacité des MIIs en fonction de l'âge des individus.

Comme il a était décrit précédemment dans ce chapitre (**Figure 54** et « **VII-2-2-1** »), une baisse des niveaux individuels de réponse IgG anti-gSG6-P1 a été observée pour la majorité des 100 individus de janvier à avril 2006 suite à l'introduction des MIIs en février 2006. En effet, cette baisse était observée chez tous (100%) les enfants de 0–6 ans en particulier (**Figure 55A**), chez 30 des 33 (environ 91%) enfants âgés de 7-14 ans (**Figure 55B**) et chez 20 des 22 (environ 91%) adolescents et adultes (>14 ans) (**Figure 55C**). De façon plus claire et précise, le calcul et la représentation des ΔDO_{MII} (= ΔDO_{avril} - $\Delta DO_{janvier}$) des individus de chacun des 3 groupes (**Figure 56**) ont montré qu'en réalité :

- chez les enfants de 0-6 ans (**Figure 56A**), le niveau d'IgG spécifiques n'avait significativement augmenté ($\Delta DO_{MII} < +0,204$) chez aucun individu en avril. Au contraire, il avait significativement baissé ($\Delta DO_{MII} < -0,204$) chez 60% (27/45) d'eux et pouvait être considéré comme stable ou inchangé ($-0,204 < \Delta DO_{MII} < +0,204$) chez 40% (18/45).

- chez les enfants âgés de 7-14 ans (**Figure 56B**), le niveau d'IgG spécifique, en avril, avait significativement baissé chez 60,6% (20/33) et augmenté que chez 3% (1/33) et pouvait être considérée comme inchangé chez 38,4% (12/33) d'eux.
- chez les adolescents et adultes (**Figure 56C**), le niveau d'IgG spécifiques en avril n'avait significativement augmenté chez aucun individu, comme pour les âgés de 0 à 6 ans. Il pouvait être considéré comme inchangé chez 40,9% (9/22) et comme ayant significativement baissé chez 59,1% (13/22) d'eux.

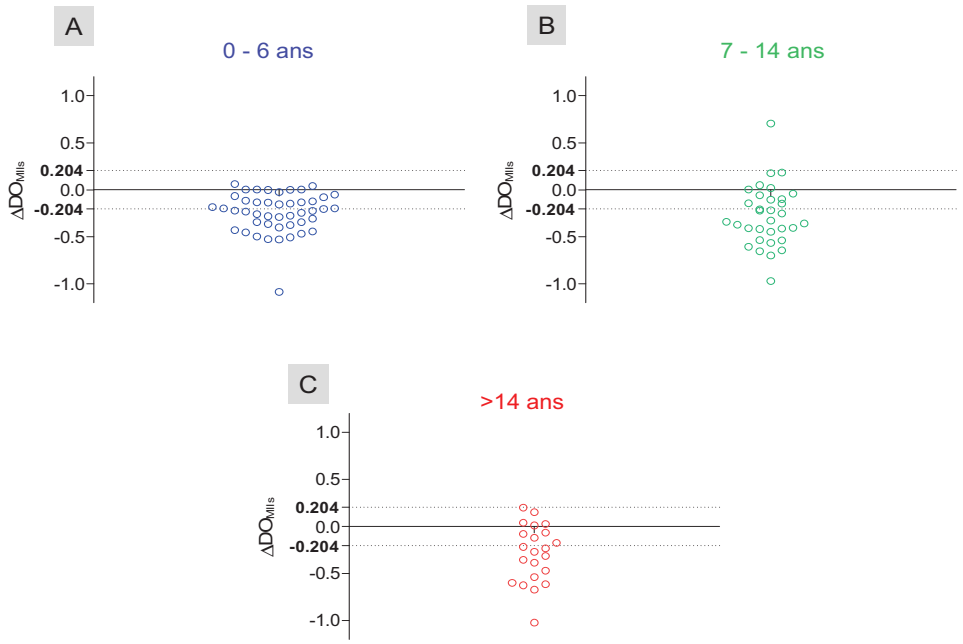


Figure 56 : Effet des MIIs sur la baisse des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge.

Donc il apparaît clair qu'en avril 2006, après la mise en place des moustiquaires, 60% des individus (60,0% des individus âgés de 0-6 ans, 60,6% des 7-14 ans et 59,1% des âgés de plus de 14 ans) ont vu leur niveau d'IgG, spécifiques au peptide salivaire d'*Anopheles* gSG6-P1, significativement baissé et seul 1% (3% des enfants âgés de 7-14 ans) significativement augmenté. Ceci suggère la réponse IgG anti-gSG6-P1 peut être un critère d'évaluation de l'efficacité des MIIs quel que soit l'âge, mais surtout chez les enfants âgés de 0-6 ans.

VII-2-2-2- Effet du sexe sur la réponse IgG anti-gSG6-P1

Pour évaluer l'effet du sexe des individus sur la réponse IgG anti-gSG6-P1, nous avons comparé l'évolution des niveaux médians chez les « hommes » et chez les « femmes » au cours de cette étude. Notre échantillon était constitué de 42 (48%) individus de sexe masculin

et de 67 (62%) individus de sexe féminin, tous âges confondus. Les résultats de cette évolution comparative sont représentés dans la **figure 57**.

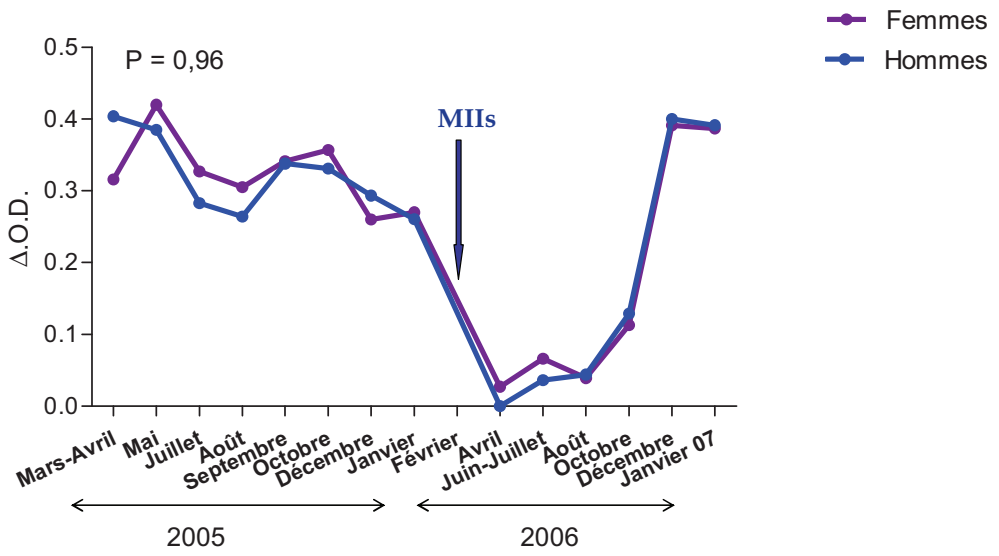


Figure 57 : Evolution des réponses IgG anti-gSG6-P1 en fonction du sexe

L'évolution des niveaux médians d'IgG anti-gSG6-P1 semblait être similaire, avant comme après la mise en place des moustiquaires, dans les deux groupes. Elle était similaire à celle des niveaux médians d'IgG anti-gSG6-P1 de la population totale (individus de sexes féminin et masculin réunis) avec les mêmes variations saisonnières d'avant moustiquaires et la forte chute observée après la mise en place des moustiquaires. Ce résultat suggérait que l'impact des moustiquaires sur la réponse IgG spécifique a été observé chez tous les individus, quel que soit leur sexe. Ceci suggère que le sexe des individus n'affecte pas la réponse IgG anti-salive et que la baisse observée des niveaux d'IgG spécifiques était similaire dans le groupe des « hommes » et dans celui des « femmes ». De plus, contrairement à l'âge, aucune différence significative de niveaux médians d'IgG spécifiques n'a été observée entre individus masculins et individus féminins, même durant les périodes des pics d'entomologie et de parasitémie. Ceci suggérait une absence d'effet du sexe sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 et que cette dernière peut être un biomarqueur d'exposition et d'efficacité de la LAV quel que soit le sexe des individus.

VII-2-3- Comparaison des réponses IgG anti-salive totale *versus* IgG anti-gSG6-P1

Les réponses IgG anti-salive totale d'*An. gambiae* et anti-gSG6-P1, ayant été étudiées chez la même cohorte d'individus, nous avons comparé l'évolution de leurs valeurs médianes

et individuelles afin de voir lequel de ces 2 outils ou indicateurs est le plus pertinent pour évaluer l'efficacité des MIIs (et autres moyens de la LAV) dans cette zone d'hypo-endémicité (**Figure 58**).

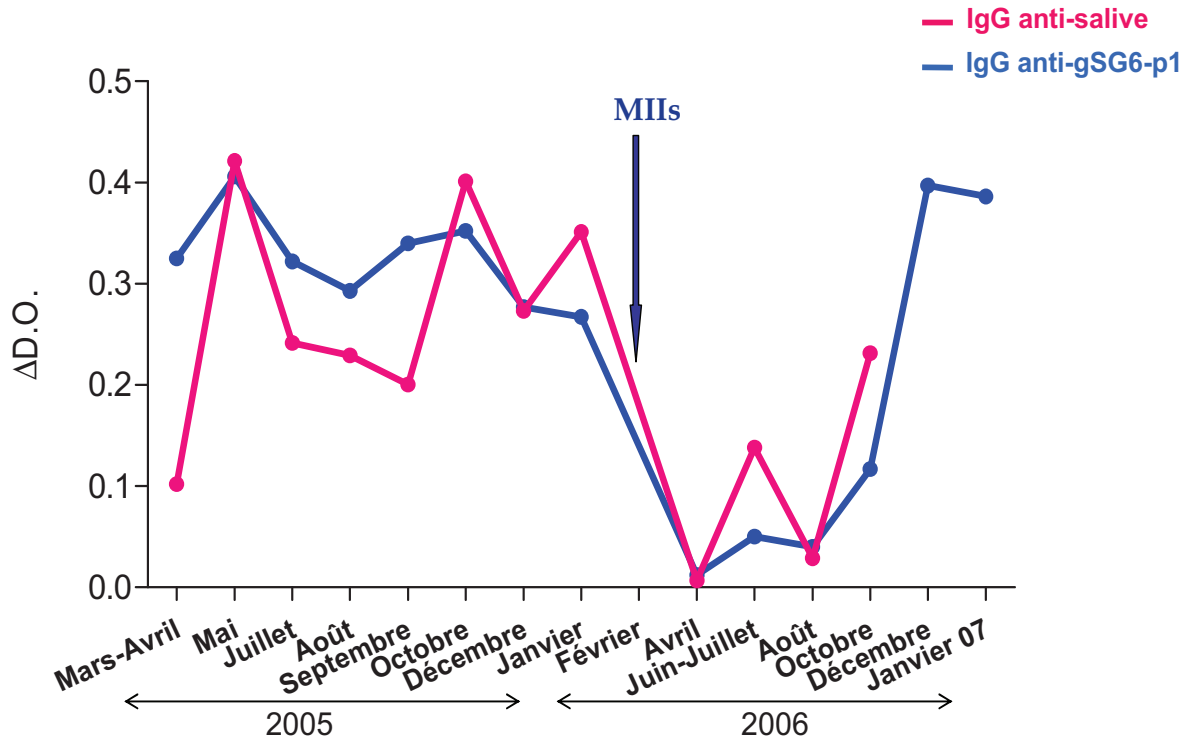


Figure 58 : Evolution comparée des réponses IgG anti-salive totale et anti-gSG6-P1 avant et après MIIs.

Ainsi, l'analyse comparée des **figures 48**, **52** et **58** montre que les réponses IgG anti-salive totale et anti-gSG6-P1 médianes et individuelles avaient globalement des évolutions similaires, avec les mêmes variations saisonnières d'avant mise en place des moustiquaires et la forte baisse (2 mois après MIIs) suivie d'une nouvelle augmentation (8 mois après MIIs) observées après mise en place des moustiquaires. Cependant, dans les détails, un certain nombre d'aspects discordants ont été observés. En effet, les écarts de réponses IgG entre individus au même moment (en mai 2005 ou jui-juillet 2006 par exemple) étaient beaucoup plus forts avec le peptide gSG6-P1 qu'avec les extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* non infectés (**Figures 48** et **52**). Malgré ces variations inviduelles intra-groupes plus fortes, les niveaux médians d'IgG spécifiques obtenus avec le peptide gSG6-P1 étaient moins variables dans leur évolution (**Figure 58**) et montraient une meilleure corrélation avec l'évolution de la parasitémie, comparés à ceux obtenus avec la salive totale. D'ailleurs, les pics significatifs de réponses IgG médianes observés en janvier 2006 (alors que y'a eu peu de moustiques récoltés et peu de pluies) et en juin-juillet 2006 (4 mois après MIIs) avec la salive totale avaient

disparu et baissé (pour devenir non significatif) avec le peptide gSG6-P1 (**Figure 58**). De plus, un effet « âge », phénomène très courant et bien connu des études portant sur le développement de la réponse immune adaptative (cellulaire comme humorale, n'a été mis en évidence qu'au niveau des pics de réponse avec le peptide gSG6-P1 et pas avec la salive totale. Un effet sexe n'a été noté cependant ni avec le gSG6-P1, ni avec la salive totale.

Cette comparaison a montré que, avant la mise en place des MIIs, le peptide gSG6-P1 (peptide spécifique à la salive d'*Anopheles*) a donné des variations inter-individuelles plus fortes et des écarts entre niveaux médians de réponses IgG spécifiques moins conséquents que ceux obtenus avec les extraits salivaires (salive totale) d'*An. gambiae*. Le peptide gSG6-P1 a aussi donné des associations (ou corrélations) positives entre résultats immunologiques et parasitologiques (outil référence pour évaluer l'efficacité de la LAV) plus claires et permis de mettre en évidence un effet « probable » de l'âge sur la réponse IgG spécifique, contrairement à la salive totale.

En résumé

Résultats Principaux

- Les taux d'IgG anti-salive d'*An. gambiae* et anti-gSG6-P1 variaient fortement d'un individu à un autre, même dans une même habitation.
- Avant MIIs, les niveaux médians d'IgG anti-salive d'*An. gambiae* et anti-gSG6-P1 des individus suivaient une évolution saisonnière avec alternance de périodes de forts taux et de faibles taux.
- Avant MIIs, l'évolution du taux d'IgG médian était bien corrélée à celles de la densité moyenne d'*An. gambiae* et de l'intensité moyenne des infections à *Plasmodium falciparum* (parasitémie moyenne).
- Après MIIs, une chute pas significative de la parasitémie moyenne et une augmentation de la densité moyenne d'*An. gambiae* ont été observées. Si bien que les pics saisonniers de réponses IgG et de parasitémie observés avant la mise en place des moustiquaires avaient disparu et alors que celui de la densité anophélienne persistait.
- Après MIIs, une baisse significative des réponses IgG anti-salive et anti-gSG6-P1 a été observée chez tous les individus, quels que soient leur âge et leur sexe. De plus, les niveaux d'IgG spécifiques à la salive totale et au peptide gSG6-P1 et la parasitémie étaient globalement significativement plus faibles en 2006 qu'en 2005 pour les mêmes mois, contrairement aux densités d'*An. gambiae.*
- L'évolution saisonnière des niveaux d'IgG observée avant MIIs et la forte baisse des niveaux d'IgG observée 2 mois après MIIs (avril 2006 comparé à janvier 2006) étaient plus marquées avec le peptide gSG6-P1 qu'avec la salive totale. Cependant la remontée du niveau IgG médian notée à partir d'octobre (8 mois après MIIs) était plus forte avec la salive totale.
- La bonne corrélation entre taux médians d'IgG et données entomologiques et parasitémie était plus nette et marquée avec le peptide gSG6-P1 qu'avec la salive totale.

Interprétation des résultats principaux

- Les réponses IgG anti-salive et anti-gSG6-P1 sont spécifiques à l'individu et à son statut vis-à-vis de l'exposition.
- Ces réponses IgG sont labiles. Elles peuvent disparaître avec une très faible ou une absence d'exposition aux piqûres des vecteurs anophèles pendant 6 semaines, indépendamment de l'âge et du sexe de l'individu.

- La réponse IgG spécifique à la salive totale ou au peptide gSG6-P1 permet une meilleure évaluation de l'exposition aux piqûres des vecteurs et de l'efficacité des MIIs (et de la LAV) que les méthodes entomologiques et parasitologiques classiques dans cette zone de faible densité d'*Anopheles*.

- La réponse IgG spécifique à la salive totale ou au peptide gSG6-P1 peut être un biomarqueur de l'exposition et un indicateur de l'utilisation individuelle de la MII à court terme. Elle peut aussi servir comme outil dans la surveillance de l'effacicité à long terme des MIIs au niveau individuel et populationnel (communautaire).

- Le gSG6-P1, grâce à une plus grande sensibilité et spécificité, évalue avec beaucoup plus de fiabilité et de précision l'exposition aux piqûres des anophèles et l'effficacité des MIIs (donc de la LAV) que la salive totale.

- Le meilleure sensibilité et spécificité du gSG6-P1 lui permettent de mettre en évidence les différences de comportement vis-à-vis de l'exposition et de l'utilisation des MIIs entre enfants et adultes.

Hypothèses de discussion

- Comment se fait l'acquisition de cette réponse IgG anti-protéines salivaires ? Par quel mécanisme ?

- Bien qu'elles soient bien corrélées à la densité anophélienne, qu'est qui explique cette forte labilité des réponses IgG anti-salive et anti-gSG6-P1 ? Par quels mécanismes ?

- Une forte baisse significative des taux d'IgG anti-salive et anti-gSG6-P1, associée à celle non significative de la parasitémie, a été observée 2 mois après MIIs, alors que la densité anophélienne avait augmenté significativement pendant la même période. Comment et par quoi expliquée cette discordance entre données entomologiques et immunologiques (réponse Ac) ? Comment expliquer cette plus forte sensibilité des réponses IgG (comparées à la parasitémie) à évaluer l'efficacité des MIIs (de la LAV) ?

- En plus de sa plus grande spécificité et sensibilité, le gSG6-P1 présenterait-il plus d'intérêt et d'applications comme biomarqueur d'exposition et d'efficacité de la LAV ? Pourrait-il être appliqué à d'autres stratégies de luttes contre *Anopheles* ? A-t-il des limites ?

- Par quel (s) mécanisme (s) peut-on expliquer le niveau plus fort d'IgG anti-gSG6-P1 chez les adultes en forte exposition ? Pourquoi pas quand l'exposition est faible ? Comment expliquer que la chute des réponses IgG spécifiques après moustiquaires soit beaucoup plus marquée chez les jeunes enfants (0-6 ans) ?

CHAPITRE VIII

LE BIOMARQUEUR gSG6-P1 ET EVALUATION DE L'EXPOSITION ET DE L'EFFICACITE DE DIVERSES STRATEGIES DE LUTTE ANTI-VECTORIELLE EN ZONES DE FAIBLE DENSITE ANOPHELIENNE

L'évaluation du risque de paludisme par la mesure du degré d'exposition aux piqûres des vecteurs est une étape cruciale et nécessaire pour un meilleur contrôle de cette maladie. Or, les moyens (entomologiques essentiellement) utilisés jusqu'ici pour mener cette évaluation présentent plusieurs limites éthiques et de sensibilité, surtout dans les contextes de faible densité anophélienne. Ces derniers concernent environ 29% de la population totale à risque de paludisme et se rencontrent principalement en saison sèche, en altitude (sommets >1500m), dans les zones arides (<800 mm de pluies/ an) et zones urbaines (WHO, 1996). Ces zones urbaines sont caractérisées, en Afrique sub-saharienne notamment, par une forte densité des populations, une grande hétérogénéité des caractéristiques socio-économiques et culturelles de leurs populations et de leur environnement local, et donc une diversité de niveaux de risque palustre (Baudon *et al.*, 1996; Machault *et al.*, 2009). De plus, l'utilisation des stratégies de lutte antipaludique (moustiquaires, serpentins, bombes aérosols, …) est souvent très répandue en milieu urbain (Doannio *et al.*, 2006). Ceci augmente la faiblesse des densités de vecteurs (et de la transmission) et rend plus délicate l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité des méthodes de lutte par les outils entomologiques et parasitologiques de référence dans ces zones sujettes à de conséquents risques d'épidémies.

L'objectif de cette étude était d'évaluer, avec le peptide biomarqueur d'exposition gSG6-P1, l'hétérogénéité du risque de paludisme et l'efficacité de l'utilisation de différentes stratégies de lutte contre les moustiques par les populations urbaines. Pour cela, le projet EPIVECT a été intégré spécifiquement à l'objectif du projet Actu-Palu (voir Chapitre Méthodes) : « Caractérisation de l'environnement urbain dakarois » dans lequel un SIG sera mis en place. L'intégration de nos données immunologiques dans ce SIG va permettre une description complète du risque de l'exposition au paludisme à Dakar. Les données immunologiques (réponses IgG) spécifiques du peptide gSG6-P1 ont été comparées dans un premier temps aux données entomologiques disponibles (F. Pages, IMTSSA) et analysées, dans un second temps, en fonction de l'utilisation de principales stratégies de lutte contre les moustiques recensées (moustiquaires, bombes, serpentins, répulsifs,…).

VIII-1- gSG6-P1, un biomarqueur pour évaluer l'hétérogénéité de l'exposition aux piqûres d'anophèles en milieu urbain

Article 3: Dramé PM, Machault V, Diallo A, Poinsignon A, Ndonky A, Cornelie S, Doucoure S, Dos-Santos S, Lalou R, Sembène M, Hesran J-Y, Pages F and Remoue F. Human IgG responses to a salivary peptide, gSG6-P1: an immuno-epidemiological tool for evaluating the exposure heterogeneity to *Anopheles* bites in Dakar region, Senegal. Soumis.

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats des dosages d'IgG anti-gSG6-P1 par ELISA dans 16 quartiers de l'étude Actu-Palu/Dakar, pour lesquels des données entomologiques (captures sur hommes) avaient été recueillies de fin juillet (2 mois avant le début de notre étude) à fin décembre 2008 (fin de notre étude) par l'équipe du Dr. F. Pages (IMTSS, Marseille) et de l'UMR MITE de l'IRD.

VIII-1-1- Répartition de l'âge des enfants et des femmes

Au total, cette partie de l'étude a concerné 1010 individus (505 ménages : 505 enfants âgés de 2-10 ans et 505 femmes âgés de plus de 18 ans) de ces 16 quartiers. L'âge moyen était de 5,5 ans (±0,6 ans d'écart type) et de 36,4 ans (±3,4 ans d'écart type), respectivement, chez ces 2 groupes d'âge. L'âge moyen des enfants et des femmes (souvent mères de ces enfants), ainsi que son intervalle de confiance (IC), est représenté pour chaque quartier (**Tableau 6**).

Ce tableau montre que l'âge moyen des enfants de 2-10 ans variait peu d'un quartier à un autre, entre un maximum de 6,50 ans (écart-type de 2,77ans) à Maka Colobane (Département de Pikine) et un minimum de 4,50 ans (écart-type de 2,42 ans) à Darou Salam 2 (Département de Pikine). De plus, ces variations n'étaient pas significatives puisque les intervalles de confiance de la moyenne maximale (5,50 ans – 7, 5, ans) et celle de la moyenne minimale (3,63 ans – 5,57 ans) se chevauchaient. Ceci suggérait que l'âge des enfants de l'étude était réparti de façon homogène dans les différents quartiers. Chez les femmes les variations de l'âge moyen étaient relativement importantes avec une valeur maximale de 43,04 ans (écart-type de 13,33 ans) à Cité pépinière (Département de Pikine) et une valeur minimale de 31,52 ans (écart-type de 9,90 ans) à Darou Salam 2. Ces variations étaient significatives entre certains quartiers, suggérant une certaine hétérogénéité dans la répartition de l'âge des femmes entre certains quartiers. C'est le cas entre Darou Salam 2 et Cité Pépinière ou entre Darou Salam 2 et Maka Colobane.

Tableau 6 : Age moyen des enfants et adultes dans chacun des 16 quartiers

Nom des sites	n	Enfants (0 - 10 ans)		Femmes (>18 ans)	
		Moy. age (±SD)	95% IC	Moy. age (±SD)	95% IC
Ngaraf (Medina)	28	5,61 (±2,54)	4,62 - 6,59	39,86 (±13,30)	34,70 - 45,01
Biscuiterie (Grand-Dakar)	30	6,18 (±2,78)	5,10 - 7,25	36,22 (±15,46)	30,65 - 41,79
Hann Montagne	38	5,60 (±2,41)	4,81 - 6,40	34,15 (±11,22)	30,50 - 37,81
Hann 3	32	5,06 (±2,33)	4,22 - 5,90	33,41 (±9,17)	30,10 - 36,71
Dieupeul 4	29	6,26 (±2,86)	5,13 - 7,39	38,76 (±14,11)	33,75 - 43,76
Cite ASECNA 1	35	5,00 (±2.18)	4,25 - 5,75	36,78 (±11,80)	32,78 - 40,77
Yoff Dagoudane	31	5,06 (±2,54)	4,15 - 5,98	40,66 (±11,18)	36,63 - 44,69
Cite SOPRIM	29	5,90 (±2,47)	4,15 - 5,99	38,07 (±9,69)	34,45 - 41,69
Golf Sud	32	5,26 (±2,62)	4,35 - 6,18	36,81 (±9,29)	33,40 - 40,21
Cheikh Wade (Guédiawaye)	30	4,87 (±2,52)	3,94 - 5,80	32,70 (±8,85)	29,40 - 36,00
Arouna Sall (Guédiawaye)	31	5,03 (±2,92)	3,94 - 6,12	33,18 (±8,20)	30,00 - 36,36
Thierno Kane (Guédiawaye)	35	5,67 (±2,44)	4,80 - 6,53	34,82 (±11,97)	30,65 - 39,00
Maka Colobane (Pikine)	30	6,50 (±2,77)	5,50 - 7,50	39,35 (±10,82)	35,39 - 43,32
Cité Pépinière (Pikine)	31	6,38 (±2,53)	5,42 - 7,34	43,04 (±13,33)	37,66 - 48,42
Darou Khoudoss (Pikine)	29	4,83 (±2,20)	4,01 - 5,65	32,68 (±8,86)	29,58 - 35,77
Darou Salam 2 (Pikine)	35	4,50 (±2,42)	3,63 - 5,57	31,52 (±9,90)	27,89 - 35,15

n: nombre d'enfants = nombre de femmes de chaque quartier chez lesquels les Ac IgG anti-gSG6-P1 ont été dosés.
SD («Standard Deviation») : l'ecart type des âges des enfants ou adultes de même quartier
95% IC: intervalle de confiance de la moyenne des âges à un risque de 1ère $\alpha = 5\%$

VIII-1-2- Peptide gSG6-P1 pour évaluer l'hétérogénéité de l'exposition et du risque de paludisme

VIII-1-2-1- Résultats de l'étude des réponses IgG anti-gSG6-P1

Les réponses IgG individuelles (points noirs) et médianes (barres rouges) spécifiques au peptide gSG6-P1 sont présentées en fonction des quartiers dans la **figure 59**.

Cette figure montre d'importantes variations de la réponse IgG spécifique entre les individus, donc entre les ménages d'un même quartier. Elle montre aussi que les niveaux médians d'IgG spécifiques étaient globalement assez faibles car étant compris entre 0,189 de ΔDO à Arouna Sall (Département de Guédiawaye) et 0,350 ΔDO à Hann Montagne (Yarakh, Département de Dakar) et à Golf Sud (Département de Guédiawaye).

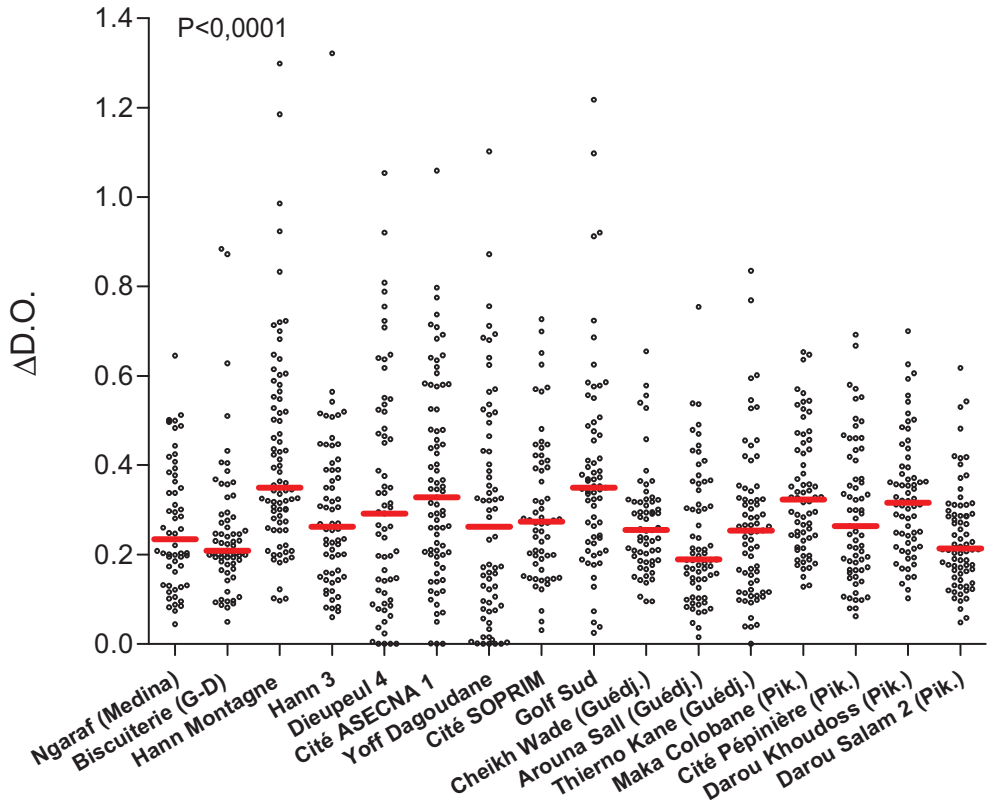


Figure 59: Réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles et médianes dans 16 quartiers de la région de Dakar

Malgré les importantes variations individuelles au sein du même quartier, les niveaux médians d'IgG spécifiques étaient significativement différents entre les quartiers (*P<0,0001*; test non paramétrique de Kruskal-Wallis). En effet, des quartiers à niveau IgG anti-gSG6-P1 médian >0,300 ΔDO (fort) comme Hann Montagne, Cité ASECNA1 (Dakar), Golf Sud, Maka Colobane et Darou Khoudoss (Pikine), s'opposaient à d'autres avec un taux d'IgG médian ne dépassant guère 0,204 ΔDO (seuil répondeur) comme Biscuiterie (Grand Dakar) et Arouna Sall ; les autres quartiers, avec des niveaux IgG anti-gSG6-P1 médians compris entre 0,204 ΔDO et 0,300 ΔDO étaient intermédiaires.

Nous avons aussi calculé et comparé la proportion d'individus répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 chez enfants et femmes, seuls ou réunis (population totale), dans chacun de ces 16 quartiers (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Proportions de répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 des enfants, des femmes, seuls ou réunis, de chacun 16 quartiers.

Nom des sites	Enfants + Femmes (Pop. totale)		Enfants (2-10 ans)		Femmes (> 18 ans)		P*
	n	Resp. (%)	n	Resp. (%)	n	Resp. (%)	
Arouna Sall (Guédiawaye)	62	27 (43,55)	31	12 (38,71)	31	15 (48,39)	0,61
Ngaraf (Medina)	56	28 (50,00)	28	10 (35,71)	28	18 (64,29)	0,06
Biscuiterie (Grand-Dakar)	60	30 (50,00)	30	12 (40,00)	30	18 (60,00)	0,20
Darou Salam 2 (Pikine)	70	38 (54,29)	35	19 (54,29)	35	19 (54,29)	1,00
Yoff Dagoudane	62	34 (54,84)	31	15 (48,39)	31	19 (61,29)	0,44
Cité Pépinière (Pikine)	62	37 (59,68)	31	18 (58,06)	31	19 (61,29)	1,00
Thierno Kane (Guédiawaye)	70	43 (61,43)	35	19 (54,29)	35	24 (68,57)	0,33
Dieupeul 4	58	36 (62,07)	29	19 (65,62)	29	17 (58,62)	0,79
Hann 3	64	41 (64,06)	32	20 (62,50)	32	21 (65,63)	1,00
Cite SOPRIM	**58**	**38 (65,52)**	**29**	**14 (48,28)**	**29**	**24 (82,76)**	**0,01**
Cheikh Wade (Guédiawaye)	60	42 (70,00)	30	22 (73,33)	30	20 (66,67)	0,78
Cite Asecna	70	52 (74,29)	35	24 (68,57)	35	28 (80,00)	0,41
Golf Sud	64	52 (81,25)	32	24 (75,00)	32	28 (87,50)	0,34
Darou Khoudoss (Pikine)	58	48 (82,76)	29	23 (79,31)	29	25 (86,21)	0,73
Maka Colobane (Pikine)	60	50 (83,33)	30	26 (86,67)	30	24 (80,00)	0,73
Hann Montagne	76	66 (86,84)	38	33 (86,84)	38	33 (86,84)	1,00

n : nombre d'individus de chaque quartier chez lesquels les Ac IgG anti-gSG6-P1 ont été dosés.
Resp. (%) : nombre (et pourcentage) d'individus répondeurs en IgG anti-gSG6-P1.
P* : p-value de la comparaison entre les % de répondeurs des enfants et des femmes d'un même quartier.

Ce tableau montre que la proportion de répondeurs dans la population totale (enfants et femmes réunis) était globalement élevée et variait d'un quartier à un autre, entre une valeur minimale (43,55%) à Arouna Sall et une valeur maximale (86,84%) à Hann Montagne. De plus, les proportions de répondeurs les plus fortes et les plus faibles étaient enregistrées dans les quartiers qui avaient, respectivement, les niveaux d'IgG spécifiques les plus forts (Hann Montagne, Golf Sud, Maka Colobane, Darou khoudoss et Cité ASECNA 1) et les plus faibles (Arouna Sall, Biscuiterie et Ngaraf-Médina). Ceci suggère une bonne association entre ces deux paramètres d'évaluation de la réponse IgG anti-antigènes de la salive d'*Anopheles*.

Chez les femmes, la proportion de répondeurs en IgG était globalement élevée et variait entre une valeur minimale de 48,39% à Arouna Sall et une valeur maximale de 86,84% à

Hann Montagne. Comme pour la population totale, les proportions de répondeurs les plus fortes étaient enregistrées dans les quartiers Hann Montagne, Golf Sud, Maka Colobane, Darou khoudoss et Cité ASECNA 1 et les plus faibles à Arouna Sall, Biscuiterie et Ngaraf-Médina. La proportion de répondeurs IgG était, cependant, forte chez les femmes à Cité SOPRIM (82,76%).

Chez les enfants, la proportion de répondeurs en IgG était globalement moins élevée comparée à celle notée chez les femmes et dans la population totale. Elle variait entre une valeur minimale de 35,71% à Ngaraf-Médina (et non à Arouna Sall comme avec la population totale et les femmes) et une valeur maximale de 86,84% à Hann Montagne (comme avec les 2 autres groupes). Comme pour la population totale et les femmes (sauf Cité SOPRIM), la proportion de répondeurs était forte dans les quartiers de Hann Montagne, Golf Sud, Maka Colobane, Darou khoudoss et Cité ASECNA 1 et faible à Arouna Sall, Biscuiterie et Ngaraf-Médina.

Ce tableau 7 montre aussi que, dans 13 des 16 quartiers, la proportion de répondeurs en IgG spécifiques était globalement plus faible chez les enfants que chez les femmes. Cependant, une différence significative entre les proportions de femmes et d'enfants répondeurs n'a été notée que pour Cité SOPRIM en faveur des femmes ($P = 0,01$; test F exact de Fischer).

En résumé, les résultats IgG spécifiques à gSG6-P1 rapportent une probable hétérogénéité de l'exposition des populations aux piqûres et donc du degré de contact Homme-*Anopheles* entre ces 16 quartiers de la région de Dakar. En effet, les populations vivant dans les quartiers de Hann Montagne (Yarakh), Golf Sud (Guédiawaye), Maka Colobane (Pikine) ou Darou khoudoss (Pikine) par exemple, semblent être beaucoup plus exposées aux piqûres des anophèles vecteurs du paludisme que celles des quartiers de Ngaraf (Médina), de Bourguiba (Grand-Dakar) ou d'Arouna Sall (Guédiawaye), les autres quartiers (Yoff-Dagoudane, Dieupeul 4, Hann 3 (Yarakh), Cheikh Wade (Guédiawaye), Thierno Kane (Guédiawaye), Darou Salam 2 (Pikine) et Cité ASECNA (Ouakam)) ayant un degré d'exposition intermédiaire.

VIII-1-2-2- Comparaison réponses IgG anti-gSG6-P1 et agressivité d'*An. gambiae.*

Pour valider le biomarqueur gSG6-P1 comme un outil pertinent pour évaluer l'exposition en milieu urbain dakarois (faible densité des vecteurs du paludisme), nous avons comparé les données immunologiques (résultats IgG anti-gSG6-P1) aux résultats de captures sur hommes

(agressivité des moustiques), même si ces dernières restaient peu fiables, vue la faiblesse des densités des anophèles en contexte urbain.

a- Résultats des captures sur hommes

Les données entomologiques ont montré que l'intensité de l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* était globalement faible. Elle variait selon les quartiers : elle était minimale à Ngaraf-Médina (Département de Dakar) avec 0,3 piqûres d'*An. gambiae*/ homme/ nuit (PHN) et maximale à Golf Sud (Département de Guédiawaye) avec 121,4 PHN. Les quartiers qui avaient les taux d'agressivité moyenne d'*An. gambiae* les plus faibles étaient Ngaraf (0,3 PHN), Yoff Dagoudane (0,4 PHN) et Biscuiterie (0,8 PHN), où la proportion de répondeurs et le niveau médian d'IgG anti-gSG6-P1 étaient faibles. Les quartiers qui avaient les taux d'agressivité moyenne d'*An. gambiae* les plus forts étaient Golf Sud (121,4 PHN), Hann Montagne (82,9 PHN), Maka Colobane (37,0 PHN) et Darou Khoudoss (33,7 PHN) où la proportion de répondeurs et le niveau médian d'IgG spécifiques étaient également plus forts.

b- Proportions de répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et taux d'agressivité d'An. gambiae

D'abord, nous avons recherché une association entre la proportion d'enfants, de femmes et d'enfants + femmes répondeurs en IgG spécifiques et le taux d'agressivité d'*An. gambiae* dans chaque quartier par la méthode de corrélation linéaire non paramétrique de Spearman. Puis nous avons fait une régression linéaire simple de la proportion de répondeurs en fonction du taux d'agressivité. Ceci visait à mieux évaluer la part des variations de cette proportion due à celles de l'agressivité entre quartiers.

Ainsi, pour la population totale (**Figure 60**), une association significative et positive (r Spearman = 0,81 ; *P<0,0001*) a été notée entre la proportion de répondeurs et le taux d'agressivité (**Figure 60A**). Ceci veut dire que dans 81% des cas, une augmentation du taux d'agressivité était associée à celle de la proportion de répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 et vice versa. De plus, le cœfficient de détermination ou d'explication (r^2 = 0,52) de la régression linéaire simple indiquait que 52% des variations de la proportion de répondeurs étaient significativement (*P = 0,0018*) dues à celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 60B**).

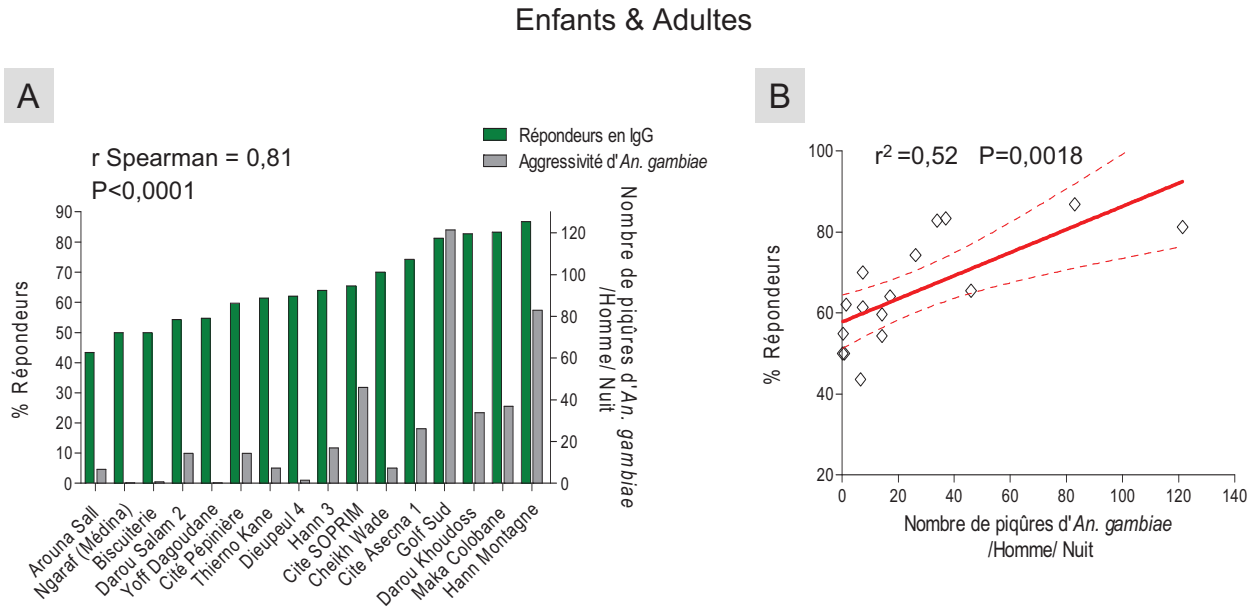


Figure 60 : Corrélation entre la proportion d'individus (femmes et enfants) répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

Chez les enfants (**Figure 61**), une augmentation du taux d'agressivité était aussi associée significativement à celle de la proportion de répondeurs en IgG anti-gSG6-P1 dans 69% des cas (r Spearman = 0,69; *P<0,0029*) (**Figure 61A**). Et seulement 33% des variations de la proportion de répondeurs étaient significativement (*P=0,019*) expliquées par celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 61B**).

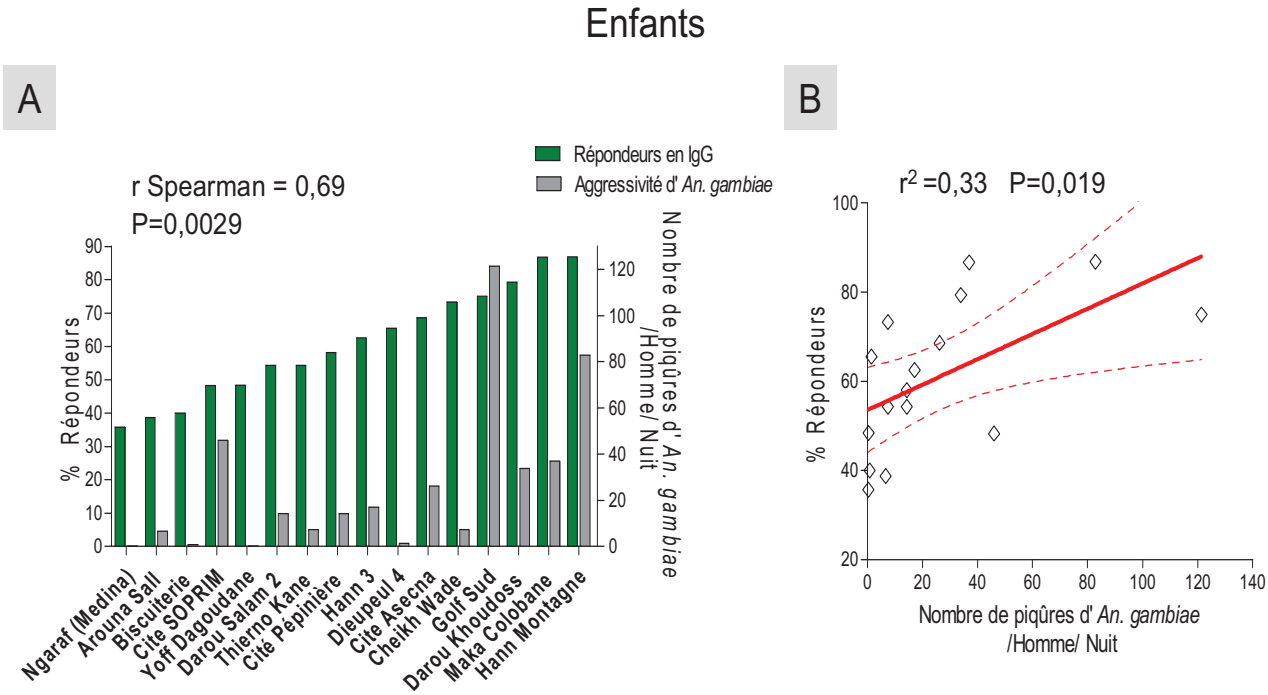


Figure 61: Corrélation entre la proportion d'enfants répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

Enfin, une augmentation du taux d'agressivité était significativement associée à celle de la proportion de femmes répondeurs dans 78% des cas (r Spearman = 0,78; *P<0,0003*) et vice versa (**Figure 62A**). Et 59% des variations de la proportion de femmes répondeurs étaient significativement (*P=0,0005*) expliquées par celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 62B**).

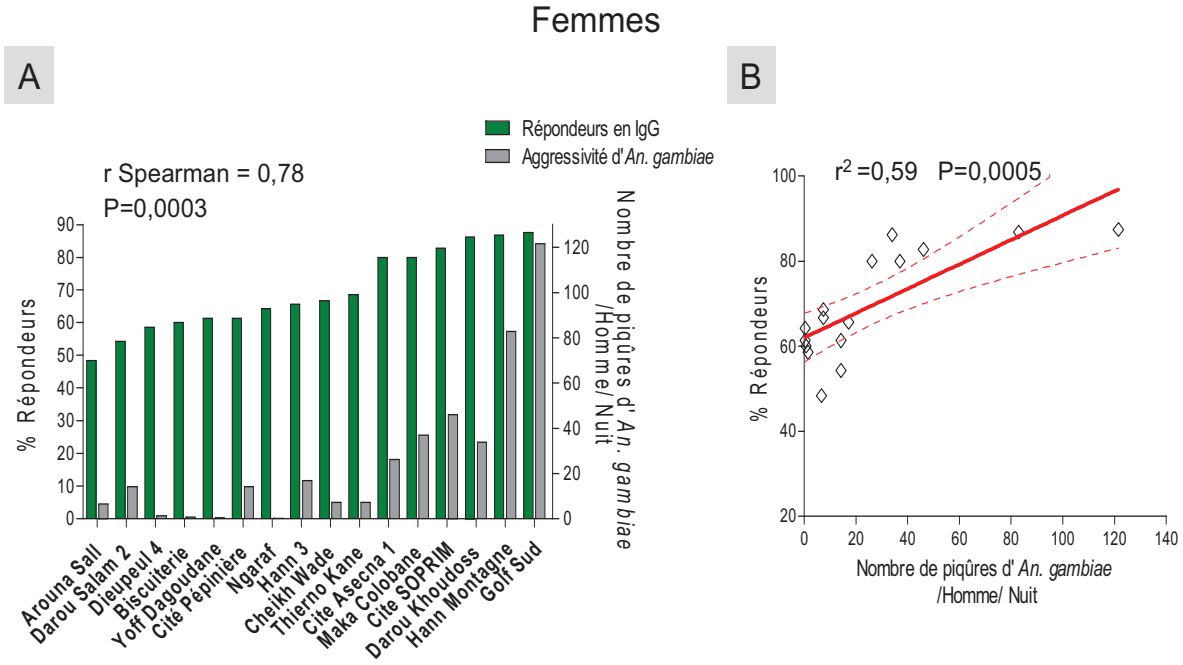


Figure 62 : Corrélation entre la proportion de femmes répondeurs IgG anti-gSG6-P1 et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

Ces résultats montrent que les variations de l'agressivité d'*An. gambiae* entre quartiers étaient associées positivement à celles de la proportion d'individus répondeurs en IgG anti-gSG6-P1, qu'ils soient enfants ou femmes, pris seuls ou réunis. Cependant, cette association positive semble être plus forte chez les femmes. D'ailleurs, c'est chez ces dernières que les variations de l'agressivité d'*An. gambiae* semblaient mieux expliquer celles de la proportion d'individus répondeurs en IgG anti-gSG6-P1.

c- Niveaux IgG anti-gSG6-P1 médians et taux d'agressivité d'An. gambiae

Comme cela a été fait avec la proportion d'individus répondeurs, nous avons recherché une association entre le niveau médian de réponse IgG anti-gSG6-P1 des enfants, des femmes et de la population totale (femmes + enfants) et le taux d'agressivité d'*An. gambiae* par la méthode de corrélation non paramétrique de Spearman. Nous avons, ensuite, fait une régression linéaire simple de ce niveau médian de réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction du

taux d'agressivité afin de mieux voir la part des variations de la réponse IgG médiane due à celles de l'agressivité entre quartiers.

Les résultats de cette comparaison ont montré que, chez la population totale (**Figure 63**), l'augmentation du taux d'agressivité était significativement associée à celle du niveau médian des réponses IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 dans 76% des cas (r Spearman = 0,76 ; *P<0,0006*) (**Figure 63A**).

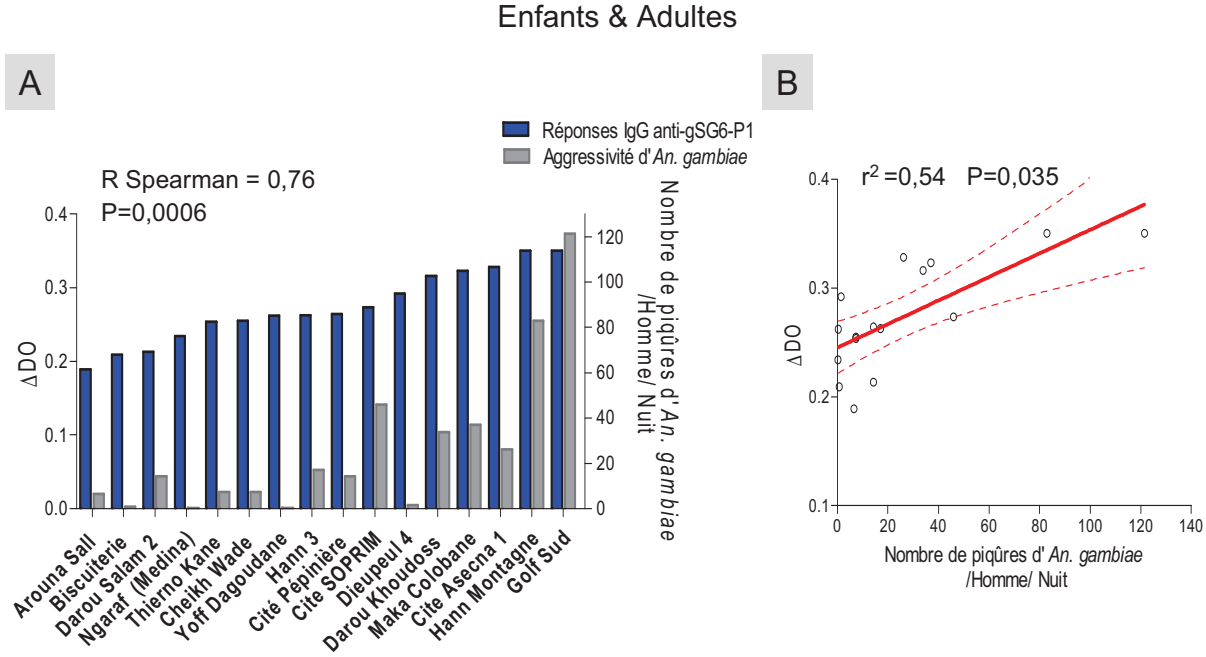


Figure 63 : Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les femmes et enfants et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

De plus, 54% des variations du niveau médian des réponses IgG spécifiques étaient significativement (*P =0,035*) expliquées par celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 63B**).

Pour les enfants, cette augmentation du taux d'agressivité d'*An. gambiae* était aussi significativement associée à celle du niveau médian des réponses IgG spécifiques dans 70% des cas (r Spearman = 0,70 ; *P<0,00025*) (**Figure 64A**). Et 54% des variations de la proportion d'enfants répondeurs étaient significativement (*P=0,019*) expliquées par celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 64B**).

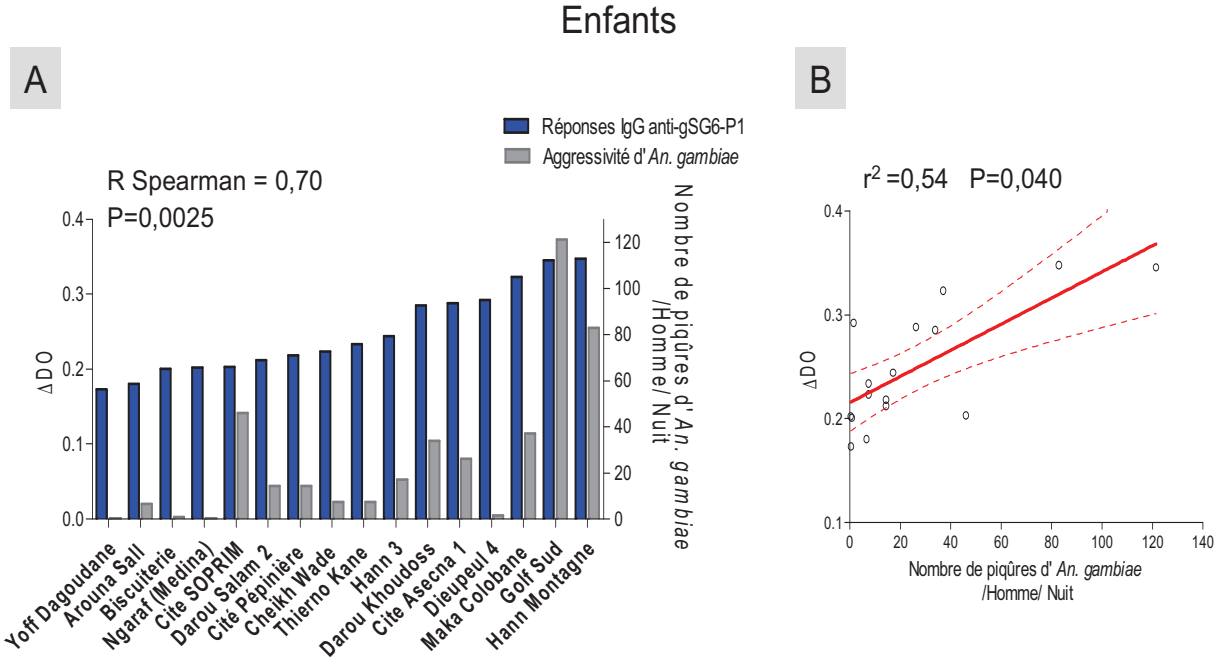


Figure 64 : Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les enfants et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

Chez les femmes, une corrélation linéaire positive (r Spearman = 0,62; *P<0,011*) a été notée entre le niveau médian des réponses IgG spécifiques et le taux d'agressivité (**Figure 65A**) : une augmentation du taux d'agressivité était associée à celle du niveau médian des réponses IgG spécifiques de ces femmes dans 62% des cas. Et seulement 29% des variations du niveau médian de réponses IgG spécifiques des femmes étaient significativement (*P=0,041*) expliquées par celles de l'agressivité d'*An. gambiae* (**Figure 65B**).

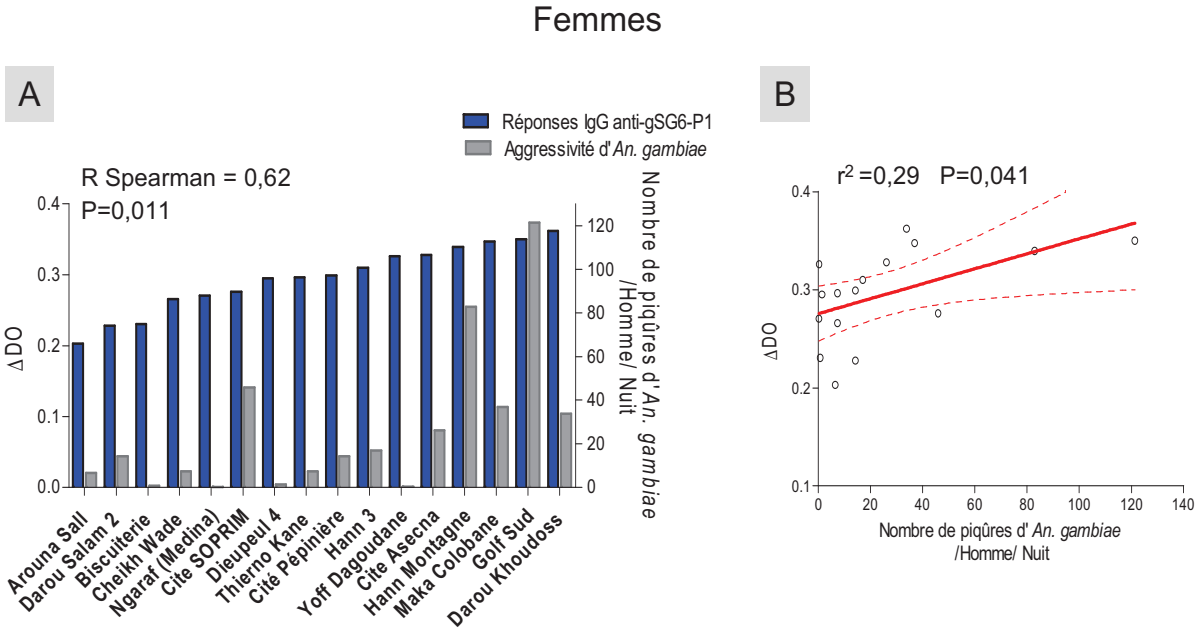


Figure 65 : Corrélation entre le niveau médian de réponse IgG spécifiques à gSG6-P1 chez les femmes et l'agressivité d'*An. gambiae* dans 16 quartiers de Dakar.

Comme observé pour la proportion d'individus répondeurs, ces résultats montrent que les variations de l'agressivité d'*An. gambiae* entre quartiers étaient positivement associées à celles du niveau médian de réponses IgG spécifiques des enfants, des femmes, seuls ou réunis. Cependant, cette corrélation positive semble être plus forte chez les enfants, contrairement à ce qui a été observé avec la proportion de répondeurs. D'ailleurs, c'est chez les enfants que les variations de l'agressivité d'*An. gambiae* semblaient mieux expliquer celles du niveau médian des réponses IgG anti-gSG6-P1.

De ces corrélations, nous avons aussi remarqué que le taux d'agressivité des moustiques (captures sur hommes) n'expliquait les variables « proportion de répondeurs » et « intensité de réponse IgG médiane » qu'à moitié au maximum (52% pour la proportion de répondeurs et 54% pour l'intensité de réponse IgG). D'autres facteurs explicatifs pouvaient alors être imaginés. D'autant plus que des quartiers comme Arouna Sall, bien qu'ayant un taux d'agressivité plus fort, avaient une réponse IgG et une proportion de répondeurs plus faibles que d'autres quartiers comme Ngaraf, Dieupeul 4, Biscuiterie et Yoff Dagoudane, à taux d'agressivité plus faibles. Ainsi, nous avons analysé, dans chaque quartier, les données de l'utilisation de la moustiquaire recueillies par des questionnaires lors de l'enquête épidémiologique (**Figure 66**).

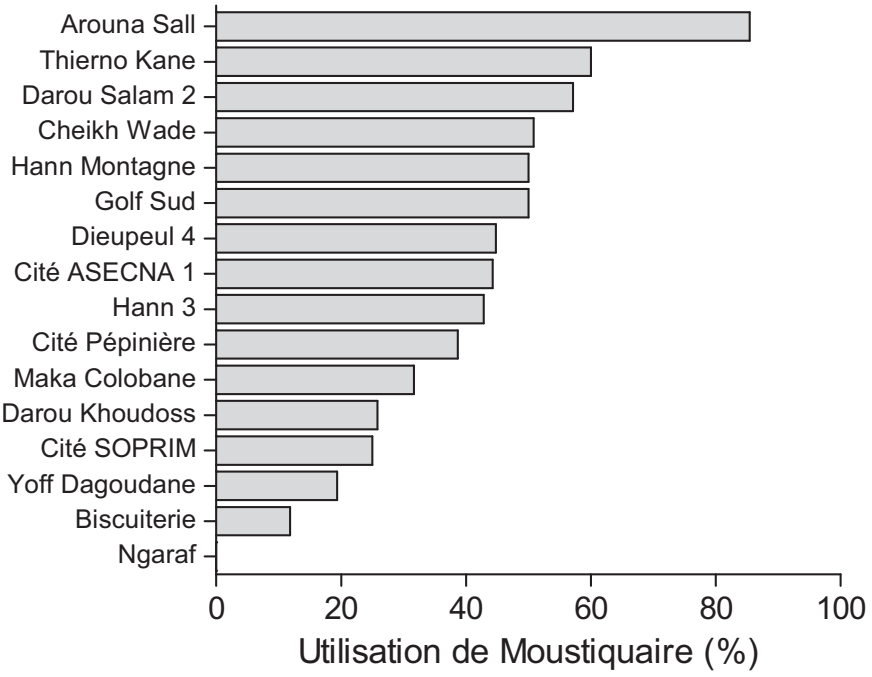


Figure 66 : Taux d'utilisation de la moustiquaire dans chacun des 16 quartiers

Les enquêtes épidémiologiques ont rapportés que la plupart des moustiquaires utilisées étaient des moustiquaires imprégnées de longue durée de marque Olyset® net ou Permanet® (données non représentées).

Par ailleurs, cette figure montre que le taux d'utilisation de la moustiquaire variait de 0,00% (0/56 individus) à Ngaraf (Médina, centre Dakar Ville) à 85,48% (53/62) à Arouna Sall (Guédiawaye, banlieue dakaroise). Pour rappel, le taux d'agressivité d'*An. gambiae* le plus faible (0,3 PHN) a été noté à Ngaraf et la proportion d'individus répondeurs (43,55%) et l'intensité médiane de réponse IgG (ΔDO=0,189) les plus faibles à Arouna Sall. Ce graphe montre aussi que le taux d'utilisation de la moustiquaire était faible (<20%) à Ngaraf, à Biscuiterie et à Yoff, des quartiers à très faible densité de moustique (<1 PNH). Alors que dans les autres quartiers (à taux d'agressivité >1 PHN) l'utilisation de la moustiquaire ne semblait pas dépendre uniquement de l'agressivité des moustiques.

De plus, une différence significative de taux d'utilisation de la moustiquaire entre des sites à taux d'agressivité similaires ou comparables a été observée. C'est le cas d'Arouna Sall, deCheikh Wade et de Thierno Kane. En effet, le taux d'utilisation de la moustiquaire était significativement plus élevé à Arouna Sall (85,48%) comparé à Thierno Kane (60,00% ; P=0,0017 ; test de Fischer) et à Cheikh Wade (50,85% ; P<0,0001), alors que le taux d'agressivité d'*An. gambiae* n'avait pas montré de différence significative entre ces 3 sites (6,4 à Arouna Sall et de 7,4 PHN à Thierno Kane et Cheikh Wade). De plus, nous avons comparé la proportion de répondeurs et l'intensité de réponse IgG médiane dans ces 3 quartiers. Les résultats ont montré que la proportion de répondeurs et l'intensité médiane de réponse IgG étaient significativement différentes à Arouna comparé à Thierno Kane et Cheikh Wade, comme cela était le cas pour le taux d'utilisation de la moustiquaire. En effet, la proportion de répondeur et l'intensité de réponse IgG étaient plus faibles à Arouna Sall comparé à Thierno Kane (*P=0,05* et *P=0,2* respectivement) et à Cheikh Wade (*P=0,003* et *P=0,03* respectivement). Ces résultats suggèrent que la faiblesse des taux d'IgG anti-gSG6-P1 à Arouna Sall était liée à une très forte utilisation des moustiquaires par la population.

En résumé, ces résultats montrent que l'étude, chez l'homme, de la réponse IgG spécifique au peptide salivaire gSG6-P1 peut permettre d'évaluer l'exposition réelle (en tenant compte de l'utilisation des méthodes de lutte ou autres) aux piqûres des vecteurs *Anopheles*, donc le risque réelle de paludisme en environnement urbain.

VIII-1-3- Le peptide gSG6-P1 : outil complémentaire pour évaluer l'exposition des populations urbaines aux anophèles vecteurs

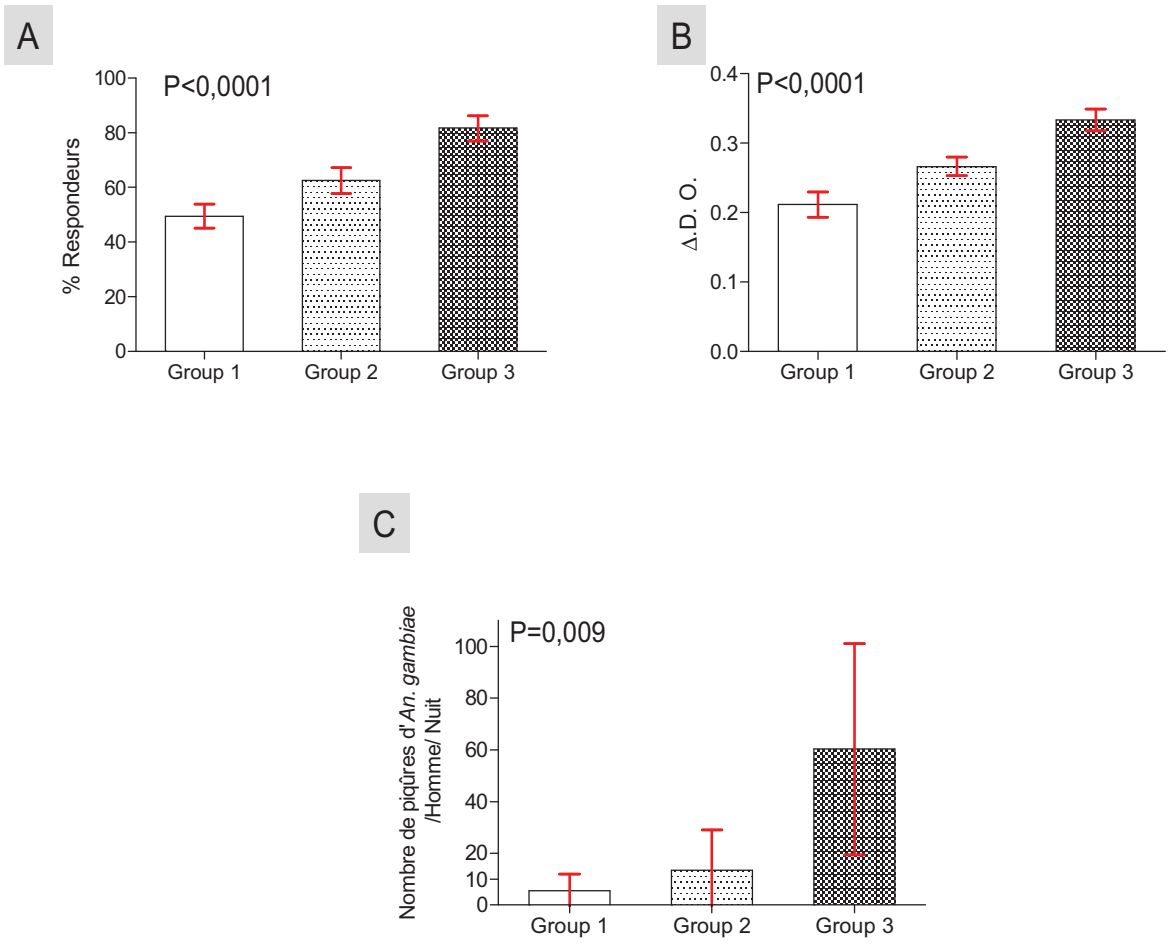
Pour confirmer la plus grande sensibilité de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1 (comparée aux captures sur hommes, la meilleure méthode entomologique) dans l'évaluation du degré d'exposition aux piqûres des anophèles et de risque de paludisme, nous avons d'abord réparti les 16 quartiers en groupes de « réponse IgG anti-gSG6-P1 ». Ces groupes ont été constitués selon la proportion d'individus (femmes et enfants) répondeurs et l'intensité médiane de réponse IgG anti-gSG6-P1 dans ces quartiers (**Tableau 8**). Deux colonnes, une pour la proportion d'individus répondeurs et une autre pour réponse IgG anti-gSG6-P1 médiane, de 16 quartiers ont été constituées. Dans chacune, les quartiers étaient disposés suivant un ordre croissant. Un numéro de rang (1 à 16) était affecté à chaque quartier dans chaque colonne selon sa position. Ce qui fait qu'un quartier avait 2 rangs (rang 1 pour la colonne « proportion de répondeur » et rang 2 la colonne « réponse IgG médiane »). Puis nous avons fait la somme de ces 2 rangs pour chaque quartier pour ainsi obtenir une 3ème colonne de rangs appelée « somme des rangs » (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Constitution des groupes d'exposition en se basant sur la réponse IgG anti-gSG6-P1.

Groupes "IgG anti-gSG6-P1"	Nom des sites	% IR IgG anti-gSG6-P1	Rang 1	Réponses médianes IgG anti-	Rang 2	Somme rangs	Piq. *An. gambiae* / Homme/Nuit
Groupe 1	Arouna Sall	43,55	1	0,189	1	2	6,6
	Biscuiterie	50,00	3	0,209	2	5	0,3
	Ngaraf (Médina)	50,00	2	0,234	4	6	0,8
	Darou Salam 2	54,29	4	0,214	3	7	14,3
Groupe 2	Yoff Dagoudane	54,84	5	0,262	7	12	0,4
	Thierno Kane	61,43	7	0,254	5	12	7,4
	Cité Pépinière	59,68	6	0,264	9	15	14,3
	Hann 3	64,06	9	0,263	8	17	17,1
	Cheikh Wade	70,00	11	0,255	6	17	7,4
	Dieupeul 4	62,07	8	0,292	11	19	1,5
	Cite SOPRIM	65,52	10	0,274	10	20	46,0
Groupe 3	Cite Asecna 1	74,29	12	0,328	14	26	26,2
	Darou Khoudoss	82,76	14	0,316	12	26	33,9
	Golf Sud	81,25	13	0,350	15	28	121,4
	Maka Colobane	83,33	15	0,323	13	28	37,0
	Hann Montagne	86,84	16	0,350	15	31	82,9

Les rangs de la colonne « somme des rangs » ont été classés en ordre croissant. Trois groupes de quartiers s'étaient dégagés et constituaient les groupes « réponse IgG anti-gSG6-P1 » : groupe 1 = groupe de faible exposition, groupe 2 = groupe d'exposition moyenne et groupe 3 = groupe de forte exposition.

Enfin, nous avons calculé et comparé les moyennes des proportions de répondeurs, des médianes de réponses IgG et des moyennes d'*An. gambiae*/ homme/ nuit des quartiers entre les 3 groupes (**Figure 67**).



<u>Figure 67</u> : Comparaison des moyennes de pourcentages de répondeurs, de médianes de réponses IgG et des taux d'agressivité moyens entre les 3 groupes « IgG anti-gSG6-P1 »

Les graphes de la figure 9 montrent que les moyennes des proportions de répondeurs (**Figure 9A**), des réponses IgG médianes (**Figure 9B**) et des taux moyens d'agressivité (**Figure 9C**) étaient, au moins, significativement différentes entre 2 des 3 groupes. Ces différences étaient plus significatives avec les proportions de répondeurs (*P<0,0001* ; test ANOVA simple) et les réponses IgG médianes (*P<0,0001*) qu'avec les taux d'agressivité d'*An. gambiae* (*P=0,009*).

De plus, une différence significative (*P<0,0001* ; test multiple de Bonferroni) avait été notée entre les moyennes des proportions de répondeurs et des réponses IgG médianes de chaque paire de groupes (groupes pris deux à deux). Alors que la comparaison entre les moyennes des taux d'agressivité, seul le groupe d'exposition forte (groupe 3) était significativement différent des autres groupes (groupes 1 et 2 = groupes d'exposition faible et moyenne respectivement) : *P<0,01* (test multiple de Bonferroni) pour groupe 3 vs groupe 1 et groupe 3 vs groupe 2. Les moyennes du taux d'agressivité des groupes 1 et 2 n'étaient pas significativement différentes contrairement à celles de la proportion de répondeurs et de la réponse IgG médiane observées dans ces 2 groupes.

En résumé, ces résultats suggèrent que la proportion d'individus répondeurs et le niveau médian de réponse IgG spécifique permettaient une meilleure évaluation de l'exposition (et de son hétérogénéité) aux piqûres d'*Anopheles*, donc du risque palustre, que le taux d'agressivité des vecteurs dans la région de Dakar (zone urbaine).

VIII-2- gSG6-P1, un biomarqueur pour évaluer l'efficacité de diverses stratégies de la LAV en milieu urbain

Article 4: **Drame P.M.,** Diallo A., Poinsignon A., Cornelie S., Ndecky A., Doucoure S., Dos-Santos S., Lalou R., Sembene M., Hesran J-Y., and Remoue F**. Human IgG response to** gSG6-P1 *Anopheles* salivary peptide to evaluate the population own-use of vector control tools in urban settings in Dakar, Senegal. En rédaction.

Dans cette partie, nous avons analysé et présenté les résultats des dosages d'IgG anti-gSG6-P1, par ELISA, de 2687 individus (1276 enfants de 2-10 ans, 1276 femmes et 135 hommes) de 45 des 50 quartiers de l'étude Actu-Palu. Les 5 autres quartiers étaient exclus des analyses pour cause du taux élevé de refus de prélèvement (sanguin) enregistré. Ces analyses ont été faites en tenant compte des éléments du questionnaire épidémiologique qui étaient de potentiels facteurs de variations de l'exposition ou du contact homme-vecteur.

VIII-2-1- Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans cette étude

D'abord nous avons listés les différentes modalités potentielles de chaque potentiel facteur de variation de l'exposition, avant de les coder par des chiffres ou lettres. Les facteurs étudiés étaient :

- la date de prélèvement des individus : avec 6 modalités codées respectivement 0 (01-15 octobre = date de référence), 1 (16-31 octobre), 2 (01-15 novembre), 3 (16-30 novembre), 4 (01-15 décembre) et 5 (16-31 décembre)
- le sexe codé 0 (sexe féminin = modalité de référence) et 1 (sexe masculin)
- l'âge des enfants : avec 0 (2-5 ans = référence) et 1 (6-10 ans)
- l'utilisation de la moustiquaire : 0 (pas de moustiquaire = référence) et 1 (moustiquaire)
- l'utilisation d'autres stratégies de lutte contre les moustiques avec 8 modalités: 0 = « pas autre lutte », 1 = « bombes aérosols », 2 = « serpentins fumigènes », 3 = « ventilateur et/ou climatiseur et/ou éventail », 4 = « encens », 5 = « bombes aérosols + serpentins fumigènes », 6 = « bombes aérosols + ventilateur » et 7 = « serpentins + ventilateur ».
- la catégorie d'âge : 0 = enfants et 1 = adultes (hommes + femmes)

Ensuite, nous avons fait (i) une analyse univariée permettant d'expliquer l'intensité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 des individus par chacune de ces variables (variables explicatives) et (ii) une analyse multivariée en intégrant toutes les variables ayant montré une p-value inférieure à 0,3 ($P<0,3$) en analyse univariée. Ces analyses ont été faites grâce à la fonction « lme » («modèle linéaire explicative») du logiciel R (RGui). Enfin, nous avons faisait tourner le modèle multivariée en excluant, à chaque fois, les variables dont les modalités n'expliquaient pas significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1. Le modèle finale n'était donc constitué que des variables et/ou modalités expliquant significativement les variations de l'intensité de la réponse IgG anti-gSG6-P1. Ce modèle a été fait en considérant la variabilité entre quartiers comme un effet fixe, donc en tenant compte de l'effet « quartier ».

Dans la population générale, 42,9% (1154/2687) des individus utilisaient la moustiquaire, 36,5% (981/2687) des serpentins fumigènes (sous forme de spirales), 10,1% (271/2687) des bombes aérosols, 6,9% (186/2687) le ventilateur et/ou le climatiseur, 2,1% (56/2687) de l'encens, 1,5% (41/2687) des bommes aérosols et des spirales à la fois ou en alternance, 1,2% (32/2687) des bombe et le ventilateur (ou/et climatiseur) et 0,5% (14/2687) des serpentins fumigènes combinés au ventilateur. L'utilisation de la moustiquaire semble conditionner celle des autres moyens de lutte. En effet, 75,6% (836/1106) des individus « avec autre lutte» (des bombes aérosols, des serpentins…) utilisaient la moustiquaire et seuls 20,1% (318/1581) des individus «avec autre lutte» l'avaient adopté.

Les variables qui expliquaient significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 et les degrés de significativité de cette relation sont représentées dans le **tableau 9** :

Tableau 9: Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes des 45 quartiers de l'étude Actu-Palu 2008.

Variables	Modalités	Nombre d'individus	Coeff	p-value test T
Adultes et enfants (n=2687; SD_{interQ}=0,075)				
	(Intercept)		0,375	0,0000
Date de prélèvement	date 3	626	-0,060	0,0347
	date 4	314	-0,060	0,0410
	date 5	353	-0,061	0,0332
Moustiquaire	**moustiq 1**	**1154**	**-0,056**	**0,0000**
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 1	271	-0,028	0,0410
	autre lutte 5	41	-0,068	0,0244
	autre lutte 6	23	-0,072	0,0315
Catégorie	**catégorie 1**	**1411**	**0,033**	**0,0000**
Enfants (n=1276; SD_{interQ}=0,064)				
	(Intercept)		0,299	0,0000
Age	**age 1**	**612**	**0,056**	**0,0000**
Moustiquaire	**moustiq 1**	**538**	**-0,043**	**0,0006**
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 5	28	-0,085	0,0156
Adultes (n=1411; SD_{interQ}=0,080)				
	(Intercept)		0,443	0,0000
Date de prélèvement	date 3	325	-0,087	0,0120
	date 4	165	-0,100	0,0063
	date 5	178	-0,100	0,0056
Moustiquaire	**moustiq 1**	**616**	**-0,065**	**0,0000**
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 1	146	-0,052	0,0086

n= nombre d'individus, SD_{interQ}= variabilité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 entre quartiers
Intercept : représente le niveau moyen de réponse IgG des individus exposés n'étant soumis à aucun de ces facteurs.
Coeff = coefficient d'explication de la régression. Il peut être positif comme négatif. Par exemple pour la moustiquaire, il signifie: quel que soit l'individu de la population totale et le quartier, l'utilisation de la moustiquaire entraînait une baisse de 0,056 de ΔDO (coeff. = -0,056)

La variabilité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 entre les 45 quartiers (variabilité inter-quartier ou écarts inter-quartiers = SD_{interQ}) était de 0,075 dans la population totale, de 0,064 dans le groupe des enfants et de 0,080 de ΔDO dans le groupe « adultes » (**tableau 9**). Cette variabilité était donc faible comparée à la variabilité (de biais) de la réponse IgG anti-sSG6-P1 au sein d'un même quartier qui était comprise entre 0,173 et 0,269 de ΔDO. Ce qui veut

dire que l'effet « quartier » était très faible et pourrait ne pas être considéré comme un facteur de variation de la réponse IgG spécifique à ce peptide. Autrement dit, les variables autres que le « quartier » suffisaient pour expliquer les différences de réponse IgG.

Dans la population totale (**Tableau 9**), l'utilisation de la moustiquaire et la catégorie d'âge étaient très significativement associées aux variations de la réponse IgG spécifique, quel que soit le quartier. En effet, la réponse IgG baissait très significativement avec l'utilisation de la moustiquaire (coeff. = -0,056 et *P<0,0001*) et était plus élevée chez les adultes comparés aux enfants (coeff. = 0,033 et *P<0,0001*). La date de prélèvement de l'individu et l'utilisation d'autres moyens de lutte pouvaient être des facteurs secondaires de variation. En effet, les individus prélevés après le 15 novembre (milieu de l'étude) avaient une réponse IgG spécifique significativement plus faible que ceux prélevés durant les 2 premières semaines de l'étude (01-15 octobre 2008). L'utilisation des bombes aérosols seules (coeff. = -0,028 et *P<0,04*) ou combinées avec celle de serpentins fumigènes (coeff. = -0,068 et *P<0,02*) ou du ventilateur/climatiseur (coeff. = -0,072 et *P<0,03*) entraînait aussi une chute significative du niveau d'IgG spécifiques à gSG6-P1.

Chez les enfants (**tableau 9**), l'utilisation de la moustiquaire et la classe d'âge (2-5 ans et 6-10 ans) expliquaient significativement les variations de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1. En effet, l'utilisation de la moustiquaire baissait très significativement la réponse IgG spécifique (coeff. = -0,043 et *P=0,0006*). Cette dernière était plus élevée chez les jeunes âgés de 6-10 ans comparés à ceux âgés de 2-5 ans (coeff. = 0,056 et *P<0,0001*). L'utilisation combinée de bombes aérosols et de serpentins fumigènes entraînait aussi une baisse significative de la réponse IgG spécifique des enfants (coeff. = -0,085 et *P=0,016*).

Chez les adultes (**tableau 9**), l'utilisation de la moustiquaire était principalement associée à une baisse de la réponse IgG (coeff. = -0,065 et *P<0,0001*). D'autres facteurs telles que l'utilisation des bombes aérosols ou la date de prélèvement étaient aussi associés à une baisse de la réponse IgG spécifique. En effet, les individus prélevés après le 15 novembre (milieu de l'étude) avaient une réponse IgG spécifique significativement plus faible que ceux prélevés durant les 2 premières semaines de l'étude (01-15 octobre 2008), comme c'était le cas dans la population totale. L'utilisation des bombes aérosols seules était aussi suivie d'une chute significative du niveau d'IgG anti-gSG6-P1 (coeff. = -0,052 et *P=0,008*).

Donc, quels que soient l'individu (enfant ou adulte) et le quartier où il vivait, l'utilisation de la moustiquaire entraînait une baisse significative de la réponse IgG anti-gSG6-P1. Cette réponse IgG spécifique était significativement plus élevée chez les enfants de 6-10 ans comparés à ceux qui avaient 2-5 ans et chez les adultes comparés aux enfants.

Nous avons aussi réparti les 45 quartiers en groupes selon leur proportion d'individus (femmes et enfants) répondeurs et leur réponse IgG anti-gSG6-P1 médiane en utilisant la même méthode que précédemment (voir **tableau 8**). Ainsi, 4 groupes de « réponse IgG anti-gSG6-P1 » s'étaient dégagés : le groupe 1 (11 quartiers) de très faible exposition, le groupe 2 (10 quartiers) de faible exposition, le groupe 3 (16 quartiers) de moyenne exposition et le groupe 4 (8 quartiers) de forte exposition.

Comme c'était le cas pour l'ensemble des 45 quartiers (voire **tableau 9**), les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 entre les quartiers des 4 groupes étaient faibles : SD_{interQ} était de 0,010 pour le groupe 1, de 0,000 pour le groupe 2, de 0,018 pour le groupe 3 et de 0,024 de ΔDO pour le groupe 4. Ce qui veut dire que l'effet « quartier » était très faible et pourrait ne pas être considéré comme un facteur de variation de la réponse IgG spécifique à ce peptide.

Les variables qui expliquaient significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 des enfants et des adultes du groupe 1 sont représentées dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 1 (11 quartiers de très faible exposition).

Variables	Modalités	Nombre d'individus	Coeff	p-value test T
Adultes et enfants (n=663; SD_{interQ}=0,010)				
	(Intercept)		0,258	0,0000
Sexe	sexe 1	198	-0,031	0,0106
Moustiquaire	**moustiq 1**	**247**	**-0,040**	**0,0009**
Enfants (n=300; SD_{interQ}=0,000)				
	Intercept		0,213	0,0000
Moustiquaire	moustiq 1	113	-0,039	0,0189
Age	**age 1**	**144**	**0,066**	**0,0001**
Adultes (n=363; SD_{interQ}=0,024)				
	(Intercept)		0,250	0,0000
Moustiquaire	moustiq 1	134	-0,032	0,0501

Ce tableau rapporte que, chez la population totale, seuls l'utilisation de la moustiquaire et le sexe étaient significativement associés aux variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1.

Cette réponse IgG spécifique baissait avec l'utilisation de la moustiquaire (coeff. = -0,040 et *P=0,0009*) et était moins élevée chez l'homme comparé à la femme (coeff. = -0,031 et *P=0,01*). Chez les enfants, le niveau d'IgG spécifiques baissait aussi avec l'utilisation de la moustiquaire (coeff. = -0,039 et *P=0,02*) et était plus élevé chez les enfants de 6-10 ans comparés aux plus jeunes (2-5 ans) (coeff. = 0,066 et *P=0,0001*). Enfin, chez les adultes, seule la moustiquaire était associée à des variations du niveau d'IgG spécifiques qui baissait significativement chez les individus qui l'utilisaient (coeff. = -0,032 et *P=0,05*).

Les variables qui expliquaient significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les individus du groupe 2 et les degrés de significativité de cette relation sont représentées dans le **tableau 11**.

Tableau 11 : Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 2 (10 quartiers de faible exposition).

Variables	Modalités	Nombre d'individus	Coeff	p-value test T
Adultes et enfants (n=609; SD_{interQ}=0,000)				
	(Intercept)		0.257440	0,0000
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 4	13	0,164	0,0017
	autre lutte 5	11	-0,113	0,0464
Catégorie	catégorie 1	310	0,042	0,0054
Enfants (n=299; SD_{interQ}=0,000)				
	(Intercept)		0,228	0,0000
Age	**age 1**	**153**	**0,072**	**0,0003**
Adultes (n=310; SD_{interQ}=0,000)				
	(Intercept)		0,327	0,0000
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 4	11	0,169	0,0082

Chez les enfants et adultes du groupe 2 réunis, seules l'utilisation d'autres méthodes de lutte et la catégorie d'âge étaient associées significativement aux variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1. Cette dernière baissait et augmentait significativement avec l'utilisation des bombes aérosols (coeff. = -0,113 et *P=0,05*) et de l'encens (coeff. = 0,164 et *P=0,002*),

respectivement, et était moins élevée chez les enfants comparés aux adultes (coeff. = 0,042 et *P=0,005*). Chez les enfants, seule la classe d'âge expliquait significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 qui était plus élevée chez les enfants de 6-10 ans que chez les 2-5 ans (coeff. = 0,072 et P=0,0003). Enfin, chez les adultes, seule l'utilisation de l'encens était associée significativement à une augmentation de la réponse IgG (coeff. = 0,169 et P=0,008), comme c'était le cas chez les enfants.

Les variables qui expliquaient significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les individus du groupe 3 et les degrés de significativité de cette relation sont représentées dans le **tableau 12**.

Tableau 12 : Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 3 (16 quartiers d'exposition moyenne).

Variables	Modalités	Nombre d'individus	Coeff	p-value test T
Adultes et enfants (n=967; SD_{interQ}=0,018)				
	(Intercept)		0,356	0,0000
Moustiquaire	**moustiq 1**	**420**	**-0,055**	**0,0000**
Catégorie	catégorie 1	502	0,028	0,0156
Enfants (n=464; SD_{interQ}=0,000)				
	(Intercept)		0,358	0,0000
Moustiquaire	moustiq 1	195	-0,064	0,0020
Age	age 1	222	0,034	0,0446
Utilisation autres moyens de lutte	autre lutte 5	11	-0,127	0,0273
Adultes (n=503; SD_{interQ}=0,020)				
	(Intercept)		0,387	0,0000
Moustiquaire	**moustiq 1**	**225**	**-0,061**	**0,0003**

Chez les enfants et adultes du groupe 3 réunis, seule l'utilisation de la moustiquaire était associée à une baisse significative de la réponse IgG anti-gSG6-P1 (coeff. = -0,055 et *P<0,0001*). La réponse IgG anti-gSG6-P1 était plus élevée chez les enfants comparés aux adultes (coeff. = 0,028 et *P=0,01*). Chez les enfants de ce groupe, la réponse IgG spécifique baissait significativement avec l'utilisation de la moustiquaire (coeff. = -0,055 et *P<0,0001*)

et des bombes aérosols (coeff. = -0,055 et *P<0,0001*) et était plus élevée chez les enfants de 6-10 ans que chez ceux âgés de 2-5 ans (coeff. = 0,034 et *P=0,04*). Enfin, chez les adultes, seule l'utilisation de la moustiquaire était associée à une diminution de la réponse IgG (coeff. = -0,061 et *P=0,0003*).

Les variables qui expliquaient significativement les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans le groupe 4 et les degrés de significativité de cette relation sont représentées dans le **tableau 13**.

Tableau 13 : Facteurs de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes du groupe 4 (8 quartiers d'exposition forte).

Variables	Modalités	Nombre d'individus	Coeff	p-value test T
Adultes et enfants (n=448; SD_{interQ}=0,024)				
	(Intercept)		0,484	0,0000
Date de prélèvement	date 5	33	- 0,118	0,0168
Moustiquaire	**moustiq 1**	**231**	**- 0,113**	**0,0000**
Catégorie	catégorie 1	244	0,057	0,0080
Enfants (n=204; SD_{interQ}=0,000)				
	(Intercept)		0,438	0,0000
Moustiquaire	**moustiq 1**	**104**	**-0,088**	**0,0021**
Age	age 1	93	0,057	0,0450
Adultes (n=244; SD_{interQ}=0,028)				
	(Intercept)		0,538	0,0000
Moustiquaire	**moustiq 1**	**127**	**-0,112**	**0,0000**

Chez les enfants et adultes du groupe 4 réunis, l'utilisation de la moustiquaire était principalement associée à une baisse significative de la réponse IgG anti-gSG6-P1 (coeff. = -0,113 et *P<0,0001*). La réponse IgG spécifique était aussi moins élevée chez les individus prélevés durant la deuxième moitié du mois de décembre comparés à ceux prélevés au début de l'étude (semaines 1 et 2 d'octobre) (coeff. = -0,118 et *P=0,02*) et chez les enfants comparés aux adultes (coeff. = 0,057 et *P=0,008*). Chez les enfants, cette réponse IgG

spécifique baissait significativement avec l'utilisation de la moustiquaire (coeff. = -0,088 et *P=0,002*) et était plus élevée chez les enfants de 6-10 ans que chez ceux âgés de 2-5 ans (coeff. = 0,057 et *P=0,04*). Enfin, chez les adultes, seule l'utilisation de la moustiquaire était associée à une diminution de la réponse IgG (coeff. = -0,112 et *P<0,0001*).

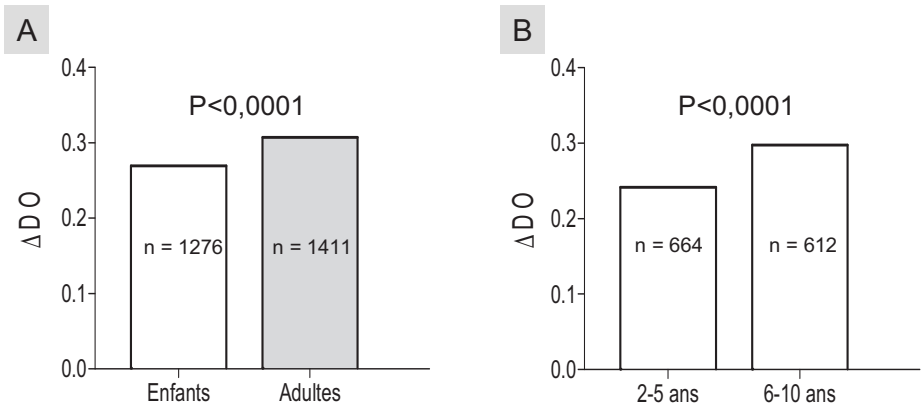
En résumé, les facteurs de variations (facteurs modificateurs ou de confusion) qui influençaient positivement ou négativement la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 dans cette étude concernant 45 quartiers de la région dakaroise étaient (i) l'utilisation de la moustiquaire, (ii) des bombes aérosols (seuls ou combinés à d'autres outils de lutte), (iii) l'âge (catégorie d'âge des individus et classe d'âge des enfants) et (iv) la date de prélèvement de l'individu. L'utilisation de la moustiquaire et l'âge semblent être des facteurs principaux, alors que la date de prélèvement et l'utilisation de bombes aérosols peuvent être classées de facteurs secondaires de variation de la réponse IgG anti-gSG6-P1. En effet, l'utilisation de la moustiquaire entraînait une baisse significative de la réponse IgG anti-gSG6-P1 quel que soit l'individu, le quartier ou le groupe d'exposition à *An. gambiae* (sauf ceux du groupe 2). La réponse IgG anti-gSG6-P1 augmentait significativement avec l'âge quel que soit le quartier ou le groupe d'exposition. Alors que l'utilisation (i) des bombes aérosols et (ii) la date de prélèvement étaient associées à une baisse de la réponse IgG, respectivement, (i) qu'en faible et moyenne exposition et (ii) qu'en forte exposition et surtout chez les adultes.

VIII-2-2- Réponse IgG anti-gSG6-P1 pour l'évaluation de l'efficacité de l'utilisation des moustiquaires par les populations urbaines

Grâce à ces résultats statistiques, nous avons par la suite orienté nos analyses vers l'étude de l'effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans les 45 quartiers réunis (population générale) et dans chaque groupe de quartiers, en tenant compte de la catégorie et la classe d'âge (facteurs de confusion ou modificateur d'effet).

VIII-2-2-1- Effet de l'âge

Nous avons comparé le niveau médian de réponse IgG spécifique à gSG6-P1 entre les enfants (n=1276) et les adultes (n=1411) d'une part (**Figure 68A)** et entre les enfants âgés de 5 ans au plus (2-5 ans ; n=664) et ceux de 6-10 ans (n=612) d'autre part (**Figure 68B**).



<u>Figure 68</u> : Niveaux médians d'IgG anti-gSG6-P1 en fonction de la catégorie et la classe d'âge.

Les résultats (**Figure 68**) montrent que la réponse IgG médiane spécifique à gSG6-P1 était plus élevée (*P<0,0001* ; test de Mann-Whitney) chez les adultes (ΔDO = 0,307) que chez les enfants (ΔDO = 0,269). Chez ces derniers, le niveau d'IgG médian était plus élevé (*P<0,0001*) chez les enfants de 6-10 ans (ΔDO = 0,300) comparés à ceux âgés de 2-5 ans (ΔDO = 0,242). Tout ceci veut dire que l'âge est un facteur de confusion ou modificateur d'effet et que pour étudier l'efficacité de l'utilisation de la moustiquaire ou autres stratégies de lutte contre les vecteurs du paludisme par la réponse IgG spécifique à gSG6-P1, il faut tenir compte de cet effet âge.

VIII-2-2-2- Utilisation de la moustiquaire et réponse IgG anti-gSG6-P1 dans la population totale

L'analyse des questionnaires épidémiologiques a montré que 57% (1533/2687) des individus interrogés déclaraient ne pas utiliser la moustiquaire contre 43% (1154/2687) qui l'utilisaient couramment, au moins, depuis 2 mois avant le début de l'enquête. La **figure 69** illustre la comparaison des médianes des réponses IgG anti-gSG6-P1 entre le groupe « sans moustiquaire » (SM en rouge) et le groupe « moustiquaire » (M en bleu).

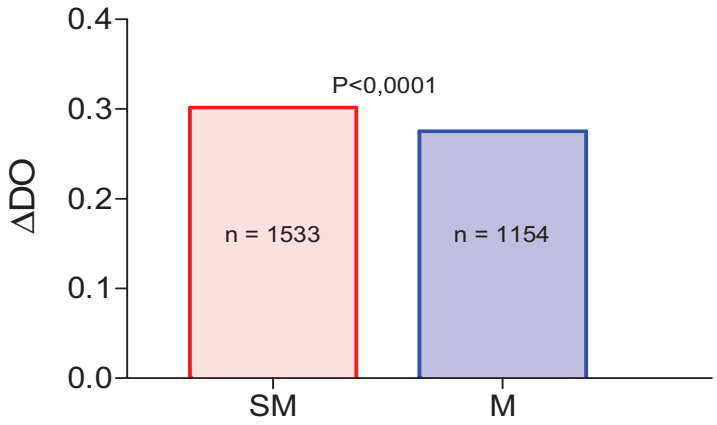


Figure 69 : Effet de l'utilisation de la moustiquaire (groupes SM et M) sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 dans la population totale

Ce graphe montre que le niveau médian de réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 était significativement plus faible dans le groupe « M » comparé au groupe « SM » (*P<0,0001* ; test de Mann-Whitney). Ce niveau médian était, en effet, de 0,275 de ΔDO dans le groupe « M » et de 0,305 de ΔDO dans le groupe « SM ».

La **figure 70** résume les résultats de cette comparaison des médianes de réponse IgG anti-gSG6-P1 entre le groupe « SM » et le groupe « M » en tenant compte de la catégorie (enfants ou adultes) (**Figure 70A**) et la classe d'âge des enfants (2-5 ans ou 6-10 ans) (**Figure 70B**).

Les résultats de l'analyse des questionnaires ont rapporté que le taux d'utilisation de la moustiquaire était de 42,2% (538/1276) et 43,7% (616/1411) chez les enfants et les adultes, respectivement. Chez les enfants, il était de 47,0% (310/659) et de 36,9% (228/617) chez les 2-5 ans et les 6-10 ans, respectivement.

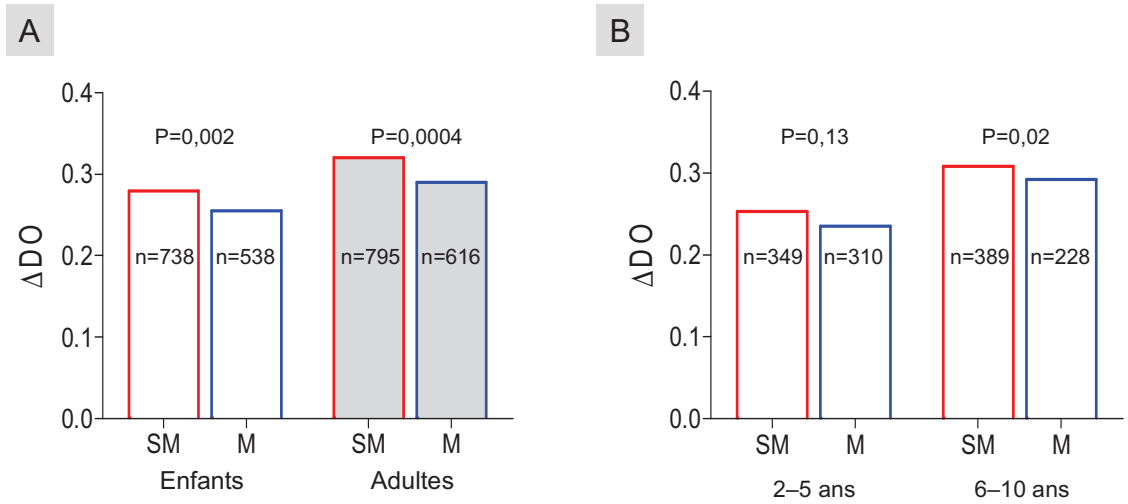


Figure 70 : Effet de l'utilisation de la moustiquaire (groupes SM et M) sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes.

Ces graphes montrent que le niveau médian de réponse IgG spécifique était plus faible avec l'utilisation de la moustiquaire de lit chez les enfants (*P=0,002*) comme chez les adultes (*P=0,0004*). Toutefois, cet effet « moustiquaire » semblait être plus marqué chez les adultes que chez les enfants. De plus, chez ces derniers, l'utilisation de la moustiquaire n'entraînait une baisse significative du niveau d'IgG que chez les plus âgés (6-10 ans ; *P=0,02*). Ces résultats suggèrent que dans cette zone de faible densité anophélienne, l'utilisation de la moustiquaire a plus d'impact chez les plus âgés (chez adultes d'abord, puis enfants âgés et enfin enfants très jeunes), d'autant plus que le taux d'utilisation la moustiquaire n'étaient pas significativement différents au sein de ces 4 groupes.

VIII-2-2-3- Utilisation de la moustiquaire et réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction des groupes d'exposition

Nous avons comparé le niveau médian de réponse IgG anti-gSG6-P1 selon l'utilisation ou non de la moustiquaire dans chaque groupe d'exposition. Le taux d'utilisation de la moustiquaire était de 37,2% (247/663) dans le groupe 1, de 42,4% (258/609) dans le groupe 2, 43,4% (420/967) dans le groupe 3 et de 51,6% (231/448) dans le groupe 4. Il était donc plus bas dans le groupe de très faible exposition et plus élevé dans le groupe de forte exposition.

La **figure 71** représente les résultats de la comparaison des médianes de réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction selon l'utilisation de la moustiquaire chez les individus (enfants et adultes regroupés) des groupes de « très faible » (**Figure 71A**), de « faible » (**Figure 71B**), de « moyenne » (**Figure 71C**) et de « forte exposition » (**Figure 71D**).

Ces graphes montrent que le niveau médian de la réponse IgG spécifique était significativement différent dans les 2 groupes (sauf pour le groupe 2 de faible exposition) : les individus M (enfants et adultes) utilisant la moustiquaire et ceux qui ne l'utilisaient pas (SM). En effet, il était significativement plus faible avec l'utilisation de la moustiquaire dans le groupe de très faible exposition (*P=0,003*), de moyenne exposition (*P<0,0001*) et de forte exposition (*P<0,0001*). Alors que dans le groupe de faible exposition, la baisse observée avec l'utilisation de la moustiquaire n'était pas significative (*P=0,06*). Ces résultats suggéraient que la réduction du taux d'IgG anti-gSG6-P1 du fait de l'utilisation de la moustiquaire était plus marquée dans les groupes de forte et moyenne exposition. Pour rappel le taux d'utilisation de la moustiquaire était plus élevé dans ces deux groupes comparés aux autres (groupes de très faible et faible exposition).

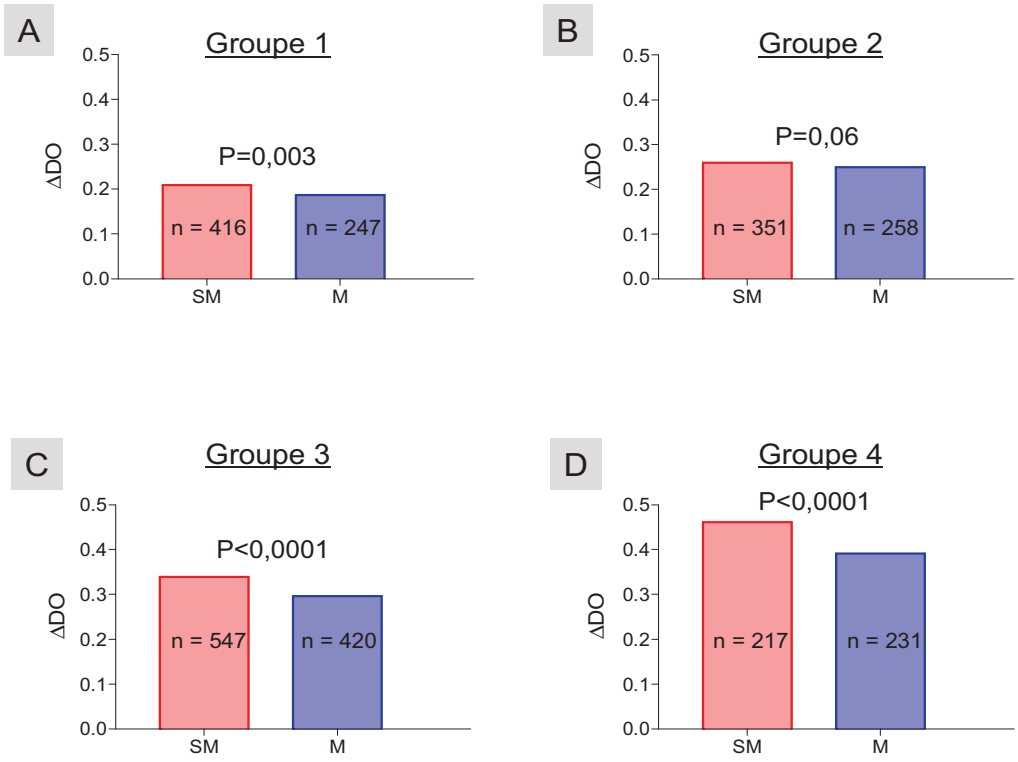


Figure 71 : Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction du groupe d'exposition (4 groupes)

Cependant, le fait que le groupe de faible exposition (groupe 2) n'avait pas montré de significativité soulevait des questions sur la pertinence de cette subdivision que nous avons par la suite révisée en regroupant les groupes 2 et 3 pour les raisons suivantes : (i) leurs taux d'utilisation de la moustiquaire (42,4% et 43,4% respectivement) étaient très proches et (ii) leurs niveaux médians de réponse IgG pas significativement différents. On se retrouvait alors avec 3 groupes « IgG anti-gSG6-P1 »: groupe 1 = faible exposition, groupe 2 (ex groupes 2 et 3) = exposition moyenne et groupe 3= forte exposition.

La comparaison des médianes de réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'utilisation ou non de la moustiquaire dans ces 3 groupes de faible (**Figure 72A**), de moyenne (**Figure 72B**) et de forte exposition (**Figure 72C**) est résumé dans la figure suivante :

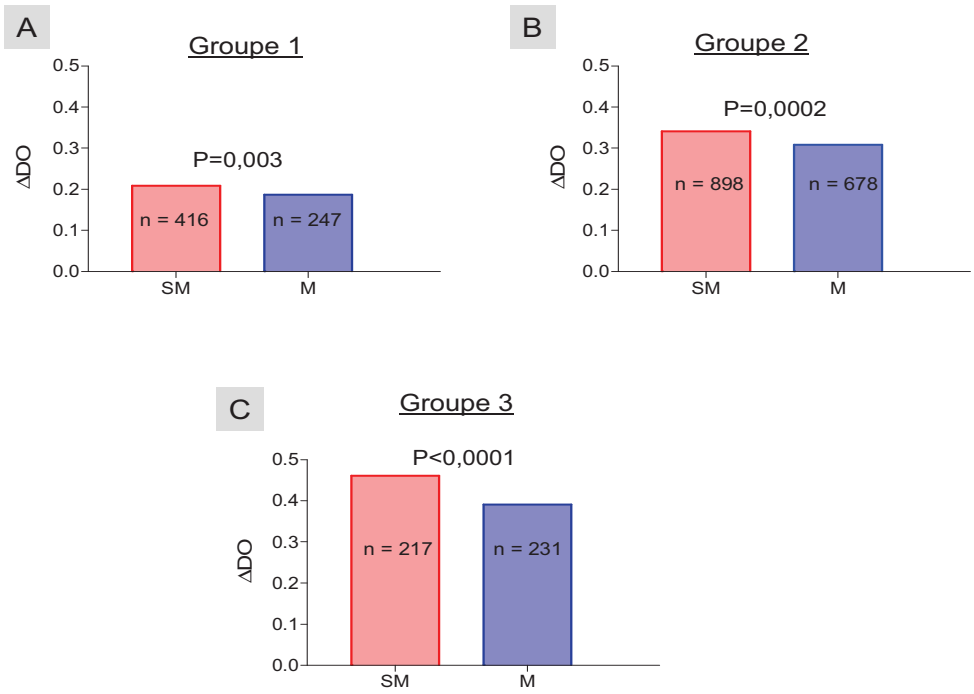


Figure 72: Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction du groupe d'exposition (3 groupes).

Le taux d'utilisation de la moustiquaire (37,2% dans le groupe 1 et 51,6% dans le groupe 3) et la différente de niveau d'IgG spécifiques entre les groupes « SM » et « M » restaient les mêmes dans les groupes 1 (**Figure 72A**) et 3 (ancien groupe 4) (**Figure 72C**) et avaient peu changé (43,0% (678/1576) et *P= 0,0002* respectivement) dans le groupe 2 (anciens groupes 2 et 3 réunis) (**figure 72B**). Les résultats de cette figure montrent de façon plus nette et claire la puissance de la réduction de la réponse IgG et l'augmentation du taux d'utilisation de la moustiquaire avec l'exposition que la figure 13. Donc la deuxième subdivision de la population générale (en 3 groupes « IgG anti-gSG6-P1 ») apparaissait plus pertinente que la première (en 4 groupes « IgG anti-gSG6-P1 ») et a été retenue.

La **figure 73** résume la comparaison, en tenant compte de la catégorie d'âge (enfants ou adultes), des médianes de réponse IgG anti-gSG6-P1 entre le groupe « SM » et le groupe « M » dans chacun des 3 groupe d'exposition.

Les résultats de l'analyse des questionnaires ont rapporté que le taux d'utilisation de la moustiquaire chez les enfants et chez les adultes était, respectivement, de 37,6% (113/300) et 36,9% (134/363) dans le groupe de faible exposition, de 42,2% (322/763) et 50,3% (409/803) dans le groupe d'exposition moyenne et de 51,0% (104/204) et 52,0% (127/244) dans le groupe d'exposition forte. Chez les adultes comme chez les enfants, l'utilisation de la moustiquaire semblait donc augmenter avec le niveau d'exposition.

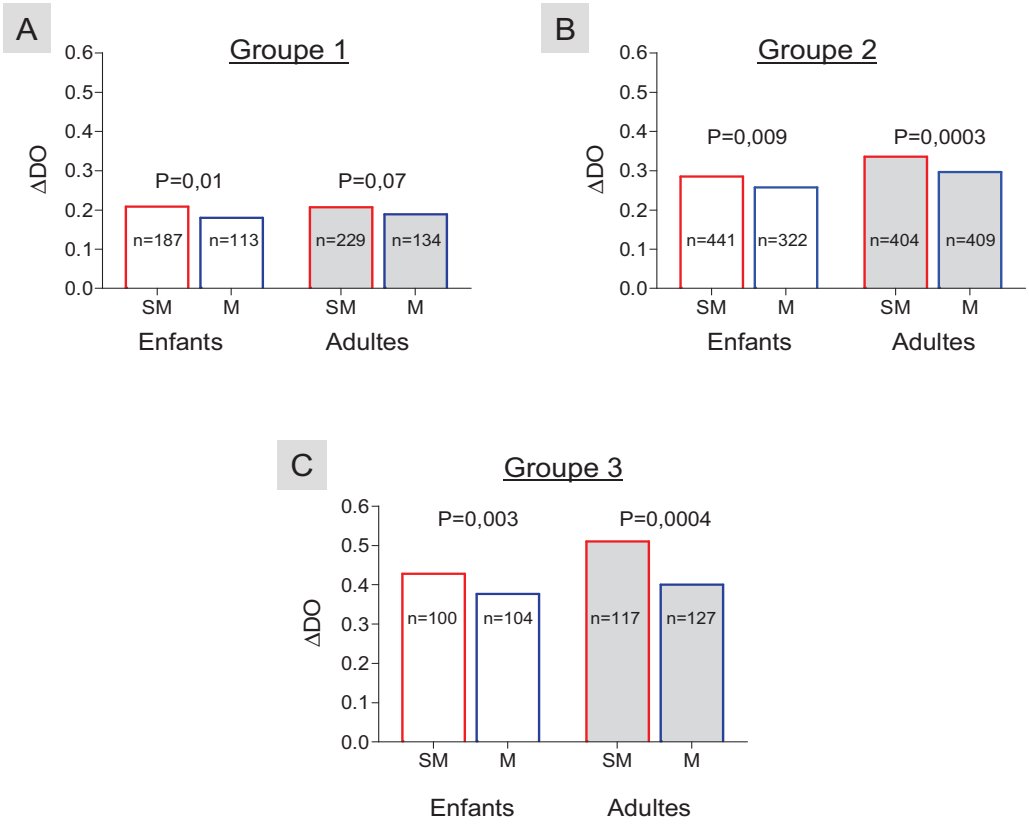


Figure 73 : Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes dans chacun des 3 groupes d'exposition

Ces graphes montrent que chez les enfants, le niveau médian de réponse IgG spécifique était significativement plus faible avec l'utilisation de la moustiquaire dans tous les groupes : *P=0,01* pour le groupe de faible exposition (**Figure 73A**), *P=0,009* pour le groupe de moyenne exposition (**Figure 73B**) et *P=0,003* pour le groupe de forte exposition (**Figure 73C**). Chez les adultes par contre, ne niveau n'avait baissé significativement que dans les 2 derniers groupes (*P=0,0003* et *P=0,0004*). Tout ceci suggère que ce soit chez les enfants ou chez les adultes, l'utilisation de la moustiquaire avait plus d'impact sur la baisse de la réponse IgG spécifique quand l'exposition était moyenne voire forte.

La **figure 74** représente la comparaison, en tenant compte de l'âge (2-5 ans ou 6-10 ans), des médianes de réponse IgG anti-gSG6-P1 entre le groupe « SM » et le groupe « M » chez les enfants de chaque groupe d'exposition.

Les taux d'utilisation de la moustiquaire chez les enfants de 2-5 ans et de 6-10 ans étaient, respectivement, de 42,9% (67/156) et 31,9% (46/144) dans le groupe de faible exposition, de 46,3% (180/388) et 37,9% (142/375) dans le groupe d'exposition moyenne et

de 56,8% (63/111) et 44,1% (41/93) dans le groupe d'exposition forte. Que que soit le groupe d'exposition, l'utilisation de la moustiquaire était plus importante chez les enfants 2-5 ans.

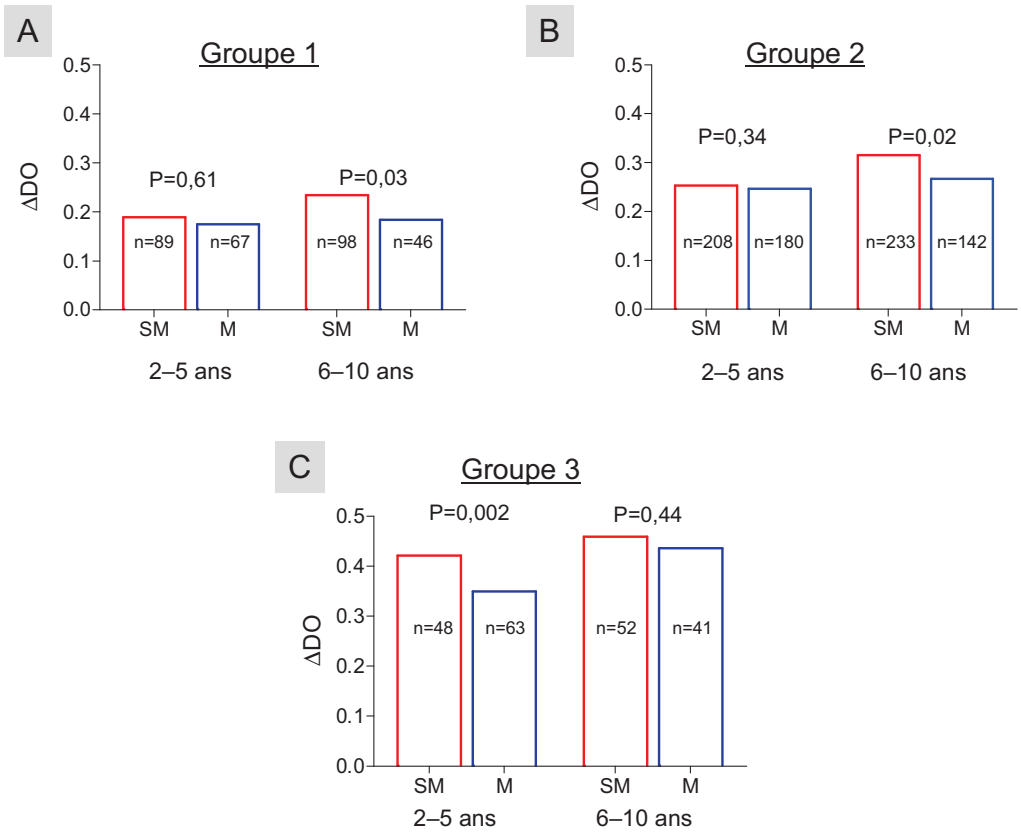


Figure 74 : Effet de l'utilisation de la moustiquaire sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge des enfants dans chacun des 3 groupes d'exposition

Ces résultats rapportent qu'une baisse significative du niveau d'IgG anti-gSG6-P1 n'a été observée chez les enfants de 2-5 ans (jeunes enfants) du groupe de forte exposition (*P=0,002*) et chez les enfants de 6-10 ans (plus âgés) des groupes de faible (*P= 0,03*) et de moyenne exposition (*P=0,02*). Ceci suggère que, dans cette zone urbaine, l'utilisation de la moustiquaire avait plus d'impact sur la baisse de la réponse IgG spécifique chez les enfants âgés : (i) de 6-10 ans en contextes de faible et moyenne exposition et (ii) de 5 ans au plus dans les zones de forte exposition.

En résumé

Résultats principaux

- De fortes variations individuelles intra-quartiers ont été observées dans la région de Dakar
- Le pourcentage d'individus répondeurs et l'intensité de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1des enfants, comme des adultes, ont montré une très forte hétérogénéité entre quartiers.
- La proportion de répondeurs et le taux d'IgG spécifiques à gSG6-P1 étaient globalement plus faibles chez les enfants que chez les adultesdans tous les quartiers étudiés.
- Chez les enfants comme chez les adultes, les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 entre quartiers étaient associées positivement à celles de l'agressivité d'*An. gambiae*. Cependant, les variations de l'agressivité d'*An. gambiae* semblaient mieux expliquer celles de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1 des adultes comparés aux enfants.
- Les réponses IgG anti-gSG6-P1 permettaient une meilleure évaluation du degré d'exposition (et de son hétérogénéité) aux piqûres d'*Anopheles*, donc du risque palustre, que le taux d'agressivité des vecteurs évalué par des méthodes entomologiques.
- L'âge, le sexe, l'utilisation de la moustiquaire et autres moyens de lutte contre les moustiques par les populations, pouvaient influencer positivement ou négativement la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1.
- L'utilisation de la moustiquaire et l'âge semblaient être les facteurs principaux, respectivement, de baisse et d'augmentation du niveau de réponse IgG anti- peptide gSG6-P1 tandis que l'utilisation de bombes aérosols était un facteur secondaire de baisse cette réponse IgG spécifique.
- Quels que soient l'individu (enfant ou adulte), le ménage, le quartier et son degré d'exposition aux piqûres, l'utilisation de la moustiquaire entraînait une baisse significative de la réponse IgG spécifique. Cette baisse était plus marquée chez les individus qui étaient plus fortement exposés.

- Cet effet moustiquaire sur la réponse IgG spécifique a été noté chez les enfants de plus de 5 ans qu'en faible et moyenne exposition alors qu'en forte exposition il n'a été observé que chez les enfants âgés de 5 ans au plus.

Interprétation des résultats principaux

- L'exposition aux piqûres et le contact Homme-Vecteur étaient différents entre individus et ménages d'un même quartier et de quartiers différents, malgré le fait que l'effet quartier ait été tenu en compte.
- Du fait de leur plus grande surface corporelle, les adultes sont naturellement plus exposés aux piqûres des anophèles urbains que les enfants et ont plus d'Ac IgG spécifiques. Une différence comportementale entre enfants et adultes vis-à-vis de l'utilisation des méthodes de lutte antivectorielle peut être envisagée.
- Les données IgG anti-gSG6-P1 permettent d'évaluer le contact Homme-Vecteur, donc une mesure réelle de l'exposition et du risque palustre, alors que le taux d'agressivité n'est forcément pas corrélé au degré de contact Homme-*Anopheles*.
- Le contact Homme-*Anopheles* dépend de différents facteurs tels que l'utilisation de la moustiquaire qui réduit sa probabilité et l'âge qui l'augmente.
- La baisse plus marquée de la réponse IgG spécifique sous l'effet de la moustiquaire dans le groupe de forte exposition peut être dûe à une augmentation du taux d'utilisation de la moustiquaire avec l'exposition.
- L'acquisition de la réponse IgG anti-gSG6-P1 avec l'âge ne se fait pas à la même vitesse entre chez des enfants exposés différemment. Elle se fait de façon plus précoce en forte exposition.

Hypothèses de discussion

- Par quoi peut-on expliquer les variations individuelles de la réponse IgG anti-gSG6-P1 au sein d'un même quartier (même niveau socio-économique des individusou même ménage) ? Les variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1 sont-elles dues uniquement à des variations du taux d'agressivité des anophèles ? Quels sont les autres facteurs socio-économiques ou culturels qui pourraient agir ? L'habitat et l'urbanisation jouent-ils un rôle ?

- Le fait que les taux d'IgG spécifiques soient plus élevés chez les adultes comparés aux enfants peut-il être expliqué uniquement par une différence naturelle d'exposition ? Des facteurs spécifiques à l'enfant ou à l'adulte, l'odeur de la sueur et la chaleur corporelle par exemple, peuvent-ils intervenir ? Existe-t-il une différence comportementale vis-à-vis de l'exposition ou de la lutte entre enfants et adultes ? Et qu'elle serait l'effet d'une différence de taux d'utilisation de la moustiquaire entre enfants et adultes sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 ?
- Comment et par quel mécanisme peut-on expliquer la réduction plus marquée du taux d'IgG entraînée par l'utilisation de la moustiquaire avec le degré d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* ?
- La réponse IgG anti-gSG6-P1 est-elle plus labile avec l'utilisation de la moustiquaire chez l'adulte que chez l'enfant ?
- Chez les enfants, quels sont les facteurs et le mécanisme de l'acquisition de cette réponse IgG spécifique ? Sont-ils les mêmes quel que soit le degré d'exposition ?

CHAPITRE IX

OPTIMISATION DU BIOMARQUEUR GSG6-P1 : INDICATEUR D'EXPOSITION A AN. FUNESTUS ET UTILISATION CHEZ LES TRES JEUNES ENFANTS (< 1 AN)

Le peptide gSG6-P1 a été validé comme biomarqueur d'exposition aux piqûres d'anophèles et comme indicateur évaluant l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide comme outil de lutte anti-vectorielle dans différents contextes épidémiologiques. Mais ces contextes étaient exclusivement des zones où les espèces du complexe *An. gambiae s. l.* étaient les seuls anophèles vecteurs du paludisme présents (Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2008a) (Chapitres 6 et 7 de cette thèse). Or, en Afrique sub-saharienne, *An. funestus* joue aussi un rôle important dans la transmission des plasmodiums à l'homme et y représente de ce fait le second vecteur du paludisme. D'ailleurs, dans plusieurs zones d'Afrique sub-saharienne, les populations d'*An. funestus,* qui atteignent souvent des densités maximales en début de saison sèche, sont capables de relayer *An. gambiae* dans la transmission du paludisme durant à la fin de l'hivernage. Un biomarqueur optimal doit donc prendre en compte à la fois l'exposition aux piqûres des vecteurs principaux (*An. gambiae* complex et *An. funestus* en Afrique subsaharienne) qui vivent souvent en sympatrie dans la plupart des régions africaines (Manguin *et al.*, 2008). Un tel biomarqueur est plausible d'autant plus qu'il a été aussi montré que les génomes de ces espèces de vecteurs étaient très proches (Coetzee and Fontenille, 2004). De plus le peptide gSG6-P1 a été retrouvé dans le sialome d'*An. funestus* avec 91% d'identité (Poinsignon *et al.*, 2008a). Ce peptide donc pourrait servir, à la fois, de biomarqueur d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*.

Un biomarqueur optimal doit aussi prendre en compte l'exposition et le risque de paludisme chez toutes les populations, même chez les nouveau-nés (ou enfants âgés de moins d'un an) qui sont, pour diverses raisons, les premières victimes du paludisme en zone d'endémie. Ces très jeunes enfants n'ont pas encore acquis une immunité antipalustre. En effet, leur système immunitaire est peu développé, ce qui les met à un risque maximal de développer un paludisme grave. De plus, ils sont faiblement exposés aux moustiques vecteurs puisque souvent protégés par leur mère ou bien par les moustiquaires à la naissance. La disponibilité d'un tel marqueur immunologique évaluant l'exposition aux *Anopheles* dans le but d'améliorer la prise en charge du paludisme concernera donc en premier lieu cette classe d'âge (et les enfants de 1- à 5 ans).

L'objectif de cette étude était donc : (i) d'évaluer l'utilité de ce peptide biomarqueur (gSG6-P1) d'*An. gambiae* dans des zones où *An. funestus* assurait principalement la transmission du paludisme (étude Pal-Fleuve/Sénégal) et (ii) de le valider comme biomarqueur chez les très jeunes enfants en étudiant l'acquisition des Ac qui lui sont

spécifiques au cours des premières piqûres et la transmission possible de ces Ac de la mère à l'enfant (étude Tori Bossito/Bénin).

IX-1- Peptide gSG6-P1: biomarqueur évaluant l'exposition à *An. funestus*

Article 5: Poinsignon A, Samb B, Doucoure S, **Drame PM**, Sarr JB, Sow C, Cornelie S, Maiga S, Thiam C, Rogerie F, Guindo S, Hermann E, Simondon F, Dia I, Riveau G, Konate L and Remoue F. A First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an imuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *An. funestus* bites. *Trop Med Int Health.* 2010 Oct;15(10):1198-203.

IX-1-1- Résultats entomologiques et parasitologiques

Des captures sur hommes effectuées pendant les mois de juin, septembre et décembre 2007 par l'équipe des Drs. I. Dia (Institut Pasteur de Dakar) et L. Konaté (UCAD, Dakar) nous ont permis d'évaluer l'agressivité d'*An. funestus,* exprimée en nombre de piqûres/ homme/nuit (PHN), dans le village de Gankette Balla (région du Fleuve Sénégal), et de suivre son évolution durant cette période. En parallèle, un suivi parasitologique des 173 enfants élèves de 1 à 9 ans du village a permis d'évaluer la prévalence de *P. falciparum*, seule espèce plasmodiale diagnostiquée, et de suivre son évolution entre juin et décembre 2004. Le taux d'agressivité d'*An. funestus* (courbe noire) et la prévalence des infections à *P. falciparum* (en barres ou bâtonnets) sont représentés dans la **figure 75**.

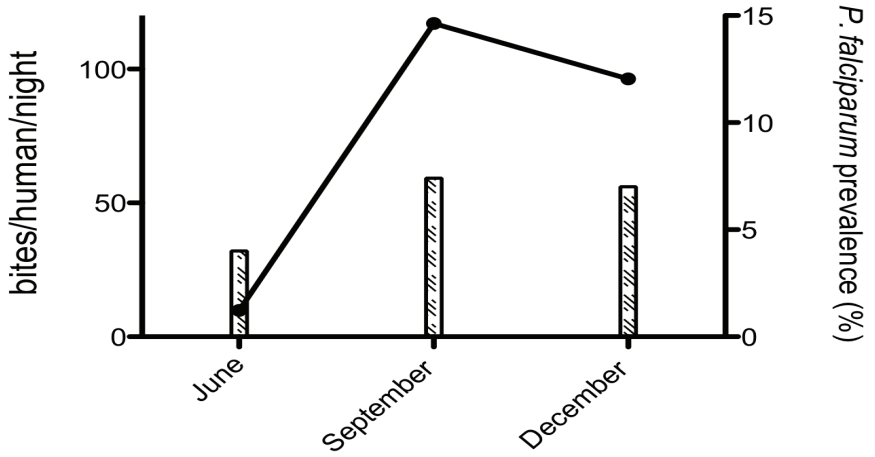


Figure 75 : Evolution des taux d'agressivité d'*An. funestus* et de prévalence moyenne des infections à *P. falciparum* entre juin et décembre 2004 dans le village de Gankette Balla.

Durant la période d'étude, le taux moyen d'agressivité d'*An. funestus,* le seul vecteur infecté dans ce village, était estimé à 9,8, 117 et 96,3 PHN en juin (fin de saison sèche), en septembre (milieu saison des pluies) et décembre (début saison sèche) respectivement. Ceci suggérait que la dynamique d'*An. funestus* suivait les saisons et donc les précipitations. Les résultats de la prévalence de *P. falciparum* indiquaient que la transmission du paludisme était faible dans ce village, puisque la prévalence maximale était de 7,4% en septembre. L'évolution de la prévalence de *P. falciparum* était positivement associée à celle du taux moyen d'agressivité d'*An. funestus.* En effet, elle augmentait de début juin (4%: 7parasités/173 au total) à la fin du mois de septembre (le pic de transmission; 7,4%: 10 enfants parasités/135 au total) et se maintenait par la suite jusqu'en décembre (7%: 11/156) **(Figure 75)**.

IX-1-2- Résultats IgG anti-gSG6-P1

La réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 a été évaluée chez les mêmes enfants en juin, septembre et décembre 2004 comme c'était le cas pour la prévalence parasitaire et le taux d'agressivité du vecteur.

Les résultats ont montré que plus des 2/3 des enfants présentaient une réponse IgG anti-gSG6-P1, même en juin où ils étaient plus faiblement exposés aux piqûres d'*An. funestus* (résultat non présenté). L'évolution de la réponse IgG anti-gSG6-P1durant la période d'étude est représentée dans la **figure 76**.

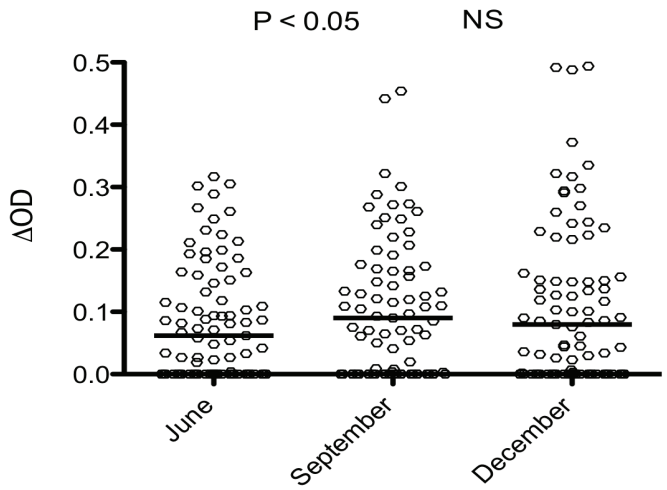


Figure 76 : Evolution de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez les 173 enfants du village de Gankette Balla entre juin et décembre 2004.

Cette figure montre que le niveau médian d'IgG spécifiques à gSG6-P1 était significativement plus élevé en septembre, période correspondant au pic d'agressivité d'*An. funestus*, comparé à juin (*P=0,02*; test pair de Wilcoxon) où l'agressivité d'*An. funestus* était plus faible. De septembre à décembre, une faible baisse du niveau médian d'IgG spécifiques à gSG6-P1 était observée, mais elle n'était pas significative. D'ailleurs le niveau d'IgG spécifiques à gSG6-P1 en décembre était resté plus élevé que celui observé en juin. Ces variations de l'évolution du niveau d'IgG spécifiques à gSG6-P1 étaient associées à celles du taux moyen d'agressivité d'*An. funestus* et celles de la prévalence des infections à *P. falciparum.* Le peptide gSG6-P1 semblait donc être un biomarqueur pertinent pour évaluer l'exposition aux piqûres d'*An. funestus*.

IX-2- Peptide gSG6-P1: biomarqueur évaluant l'exposition chez les très jeunes enfants et nouveau-nés

Article 6: Drame PM, Poinsignon A, Dechavanne C, Cotterel G, Farce M, Courtin D., Fievet N, Assougbodji A, Miguot-Nabias F, Garcia A and Remoue F. First-years life acquisition of human IgG response specific to salivary gSG6-P1 peptide, a immuno-epidemiological tool for evaluating exposure to *Anopheles* bites. En redaction.

Pour répondre à cet objectif, nous avons étudié, chez 127 nouveau-nés, l'acquisition d'IgG anti-gSG6-P1 de leurs mamans (transmission mère enfant via le placenta) et des piqûres de moustiques. Nous avons ainsi évalué le niveau IgG spécifique à gSG6-P1 dans leur sang à 3, 6, 9 et 12 mois de leur vie, dans le sang périphérique de leurs mères (prélevé lors des heures précédant l'accouchement) et dans le sang de leur cordon ombilical (prélevé lors de l'accouchement).

IX-2-1- Acquisition et évolution du taux d'IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants au cours des premiers mois de vie

Le profil des réponses IgG anti-gSG6-P1 individuelles et l'évolution des médianes du taux d'IgG au cours des premiers mois de vie est représentée sur la **figure 77**.

L'analyse de la **figure 77** montre qu'il existe de fortes variations de réponses IgG individuelles (points noirs sur la figure) au sein d'un même groupe d'âge (variations intragroupes) mais aussi entre les différents groupes d'âge (variations intergroupes). Ce qui semblait dire que chaque réponse IgG était spécifique à l'individu. En observant l'évolution

des médianes de la réponse IgG anti-gSG6-P1 (en barres noires), on constate, de façon générale, que le taux d'IgG anti-gSG6-P1 augmentait en fonction de l'âge (de 3 à 12 mois). En effet, il était faible en M3 (3 mois après la naissance) et avait augmenté de façon significative entre 3 et 6 mois (*P<0,0001;* test de comparaison multiple de Bonferroni) et entre 6 et 9 mois (*P<0,001*). Cependant, cette augmentation n'était pas significative entre 9 mois et 12 mois n'est (P>0,05). Ce qui suggère une stabilité du taux médian d'IgG spécifiques entre 9 et 12 mois.

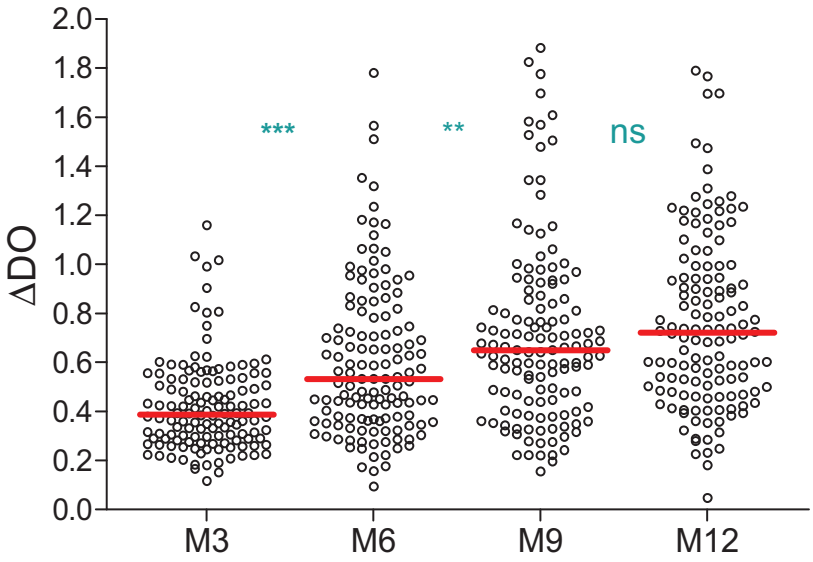


Figure 77 : Evolution du taux d'IgG chez les enfants au cours de la première année de vie

L'analyse de ce graphe nous permet aussi de dire qu'il est possible de détecter par Elisa des Ac IgG anti-gSG6-P1 (spécifique à *Anopheles*) chez des enfants âgés de moins d'un an, ce qui signifie que même les très jeunes enfants sont exposés aux piqûres d'*Anopheles* dans cette zone d'hyperendémicité palustre.

IX-2-2- La transmission d'IgG anti-gSG-P1 de la mère à l'enfant

Comme les anticorps anti-*Plasmodium* conférant à l'enfant non immun une protection durant les 1er mois de vie, des anticorps anti-protéines salivaires pourrait être aussi transmis de la mère à l'enfant pendant la grossesse et durant les premiers mois de vie. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les réponses IgG anti-gSG6-P1 des enfants en M3 à celles des mamans correspondantes (CI) et celles du sang de leur cordon ombilical (CO). Les résultats obtenus sont exprimés en taux médians et représentés dans la **figure 78.**

L'analyse de cette figure montre que les médianes de réponses IgG spécifiques étaient similaires entre le sang circulant des mamans et celui du cordon ombilical des enfants. Les médianes de réponses IgG entre les sérums du cordon ombilical des enfants et ceux du sang périphérique des mamans correspondantes n'étaient pas significativement différentes (test pair de Wilcoxon). Ce qui suggère que le taux d'IgG anti-gSG6-P1 du sang des mamans des enfants était similaire à celui transmis par le cordon ombilical (CO).

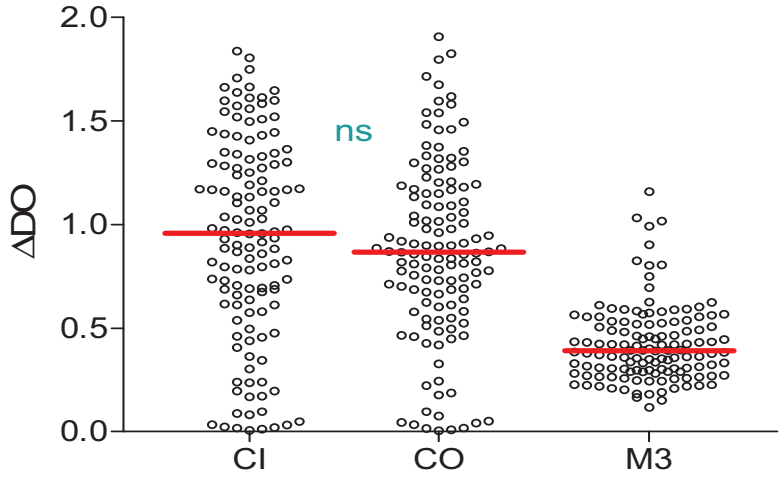


Figure 78 : Transmission probable d'IgG anti-gSG6-P1 de la maman à l'enfant

Pour confirmer cette hypothèse nous avons recherché une corrélation possible entre les réponses IgG anti-gSG6-P1 des mamans et du sang du CO des enfants (**Figure 79**)

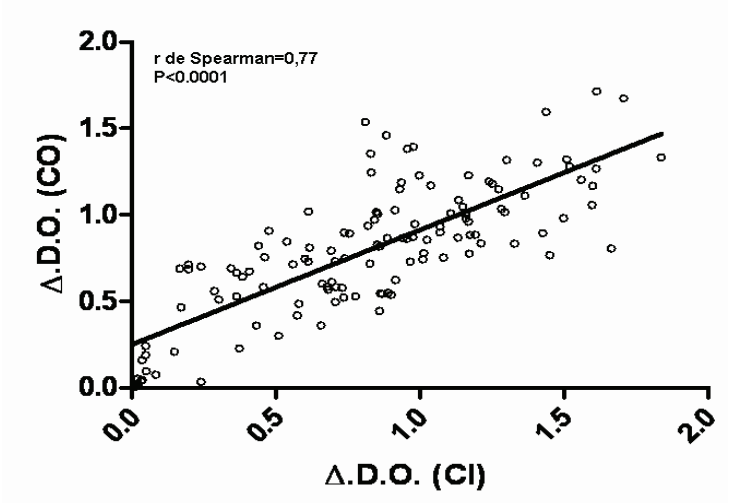


Figure 79 : Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 des mamans (CI) et du cordon ombilical des enfants (CO).

Ce graphe montre une très bonne corrélation (r de Spearman= +0,77 et *P<0,0001*) des réponses IgG anti-gSG6-P1 entre les groupes CI et CO confirmant l'hypothèse que les IgG anti-gSG6-P1 du sang du cordon ombilical étaient bien ceux de la maman. De plus, ce résultat

suggérait que ces IgG anti-gSG6-P1 des mamans étaient transmis aux nouveau-nés via le placenta. Ceci pourrait expliquer le fait qu'on ait détecté des Ac IgG anti-gSG6-P1 chez ces enfants âgés de 3 mois alors que leur système immunitaire n'est pas encore en place et ces enfants de 3 mois seraient très peu exposés aux piqûres d'*Anopheles*.

A partir de ce moment, nous avons effectué une comparaison, par le test de corrélation de Spearman, entre le taux d'IgG anti-gSG6-P1 dans le cordon ombilical et chez les enfants de 3 mois. Les résultats semblaient confirmer l'hypothèse d'une possible transmission des IgG anti-gSG6-P1 de la mère à l'enfant (**Figure 80**). En effet, une corrélation significative et positive (r de Spearman=0,43 et *P<0,0001*) de l'ordre de 43% a été observée entre le niveau d'IgG anti-gSG6-P1 du sang du CO et celui des enfants âgés de 3 mois (**Figure 77**). Ce qui veut dire que dans 43% des cas, une variation du niveau d'IgG anti-gSG6-P1 du sang du cordon ombilical était associée à celle du niveau d'IgG anti-gSG6-P1chez l'enfant de 3 mois.

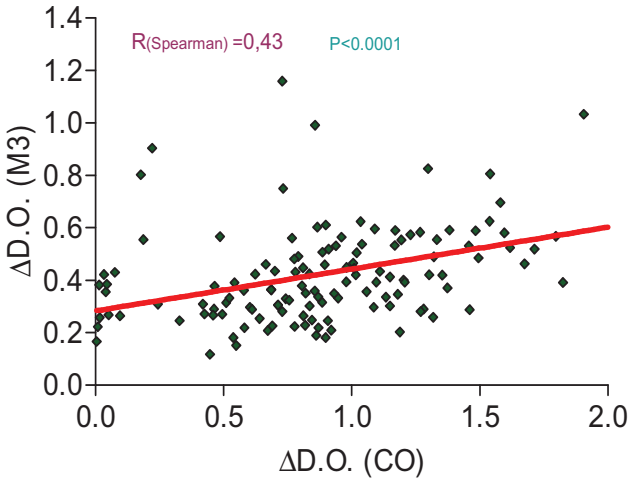


Figure 80 : Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 du sang du CO et des enfants en M3

Nous avons aussi subdivisé les enfants en deux groupes, les faibles répondeurs en M3 (ΔDO < 0,4 = valeur médiane) et le forts répondeurs en M3 (ΔDO > 0,4) et comparé leur niveau d'IgG anti-gSG6-P1 dans le cordon ombilical et chez leurs mamans (**Figure 81**).

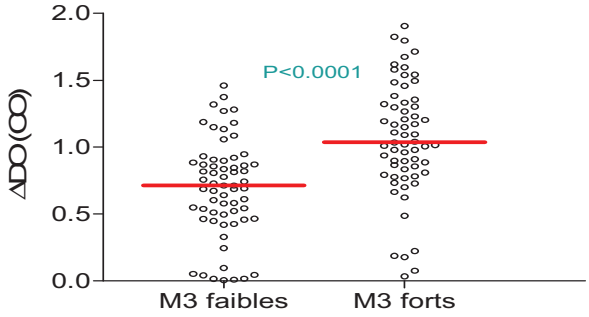


Figure 81 : Comparaison du taux d'IgG du sang du cordon ombilical entre les enfants forts répondeurs et les faibles répondeurs en M3.

Ce graphe montre que les enfants forts répondeurs en M3 étaient ceux qui avaient un plus fort taux d'IgG anti-gSG6-P1 dans leur cordon ombilical, donc ceux dont les mères avaient un niveau plus élevé d'IgG anti-gSG6-P1. En effet le niveau d'IgG anti-gSG6-P1 dans le cordon ombilical était significativement plus élevé chez les forts comparés faibles répondeurs en M3 (*P<0,0001*; test pair de Wilcoxon). Ce qui semblait dire que l'intensité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 à 3 mois après la naissance dépendait du taux d'IgG spécifiques des mamans et dans le sang du CO de l'enfant.

IX-2-3- Evolution comparée des taux d'IgG anti-gSG6-P1 des enfants forts et faibles répondeurs en M3

Pour répondre à cet objectif, nous avons évalué et comparé la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 à l'âge de 6, 9 et 12 mois entre ces 2 groupes d'enfants (forts et faibles répondeurs en M3) (**Figure 82**).

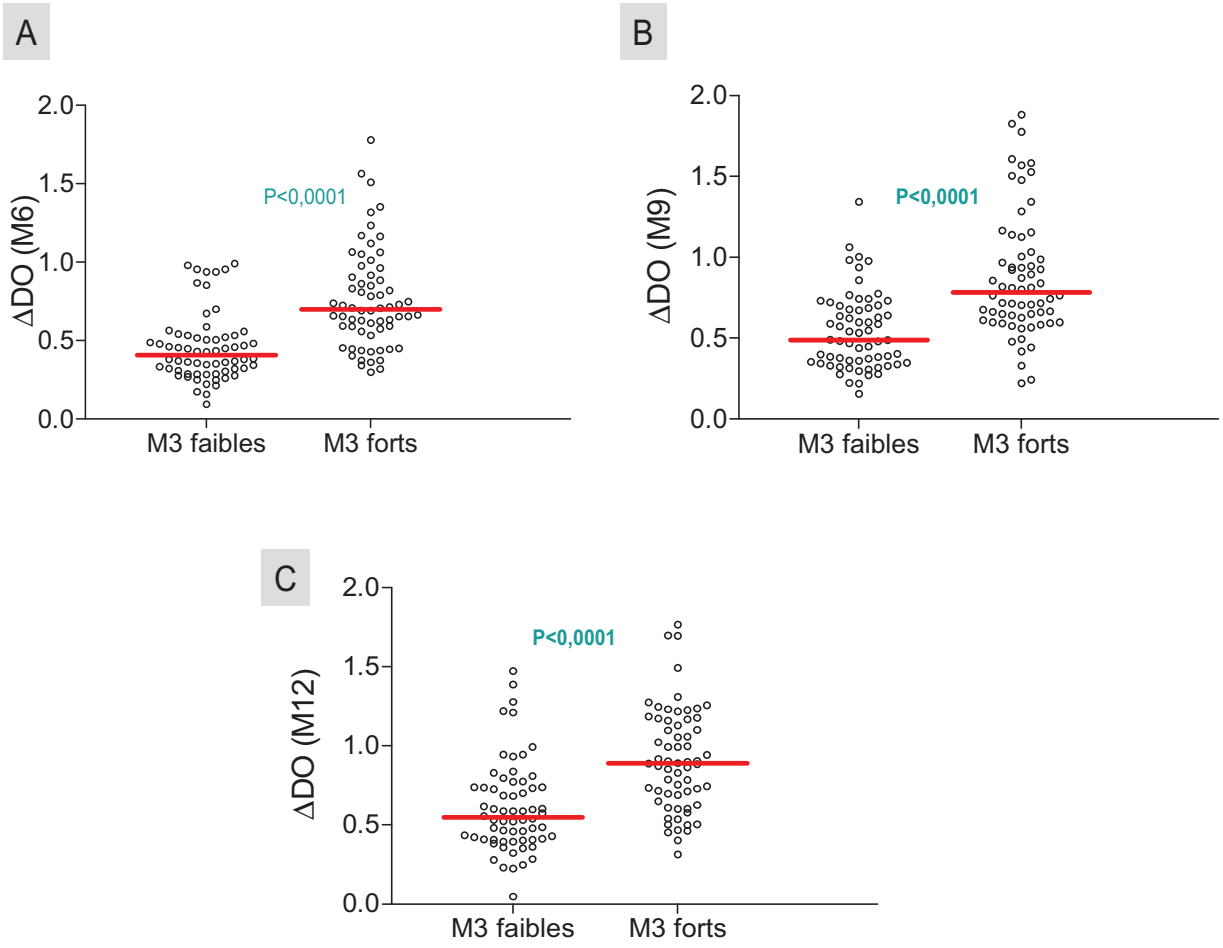


Figure 82 : Comparaison du taux d'IgG anti-gSG6-P1 à 6 (A), 9 (B) et 12 (C) mois entre les enfants forts et faibles répondeurs à 3 mois (en M3).

Pour confirmer cette hypothèse nous avons comparé les réponses IgG anti-gSG6-P1 des ces 2 groupes d'enfants avec celles détectées à 6 mois (**Figure 83A**), 9 mois (**Figure 83B**) et 12 mois (**Figure 83C**) par la méthode de corrélation de Spearman.

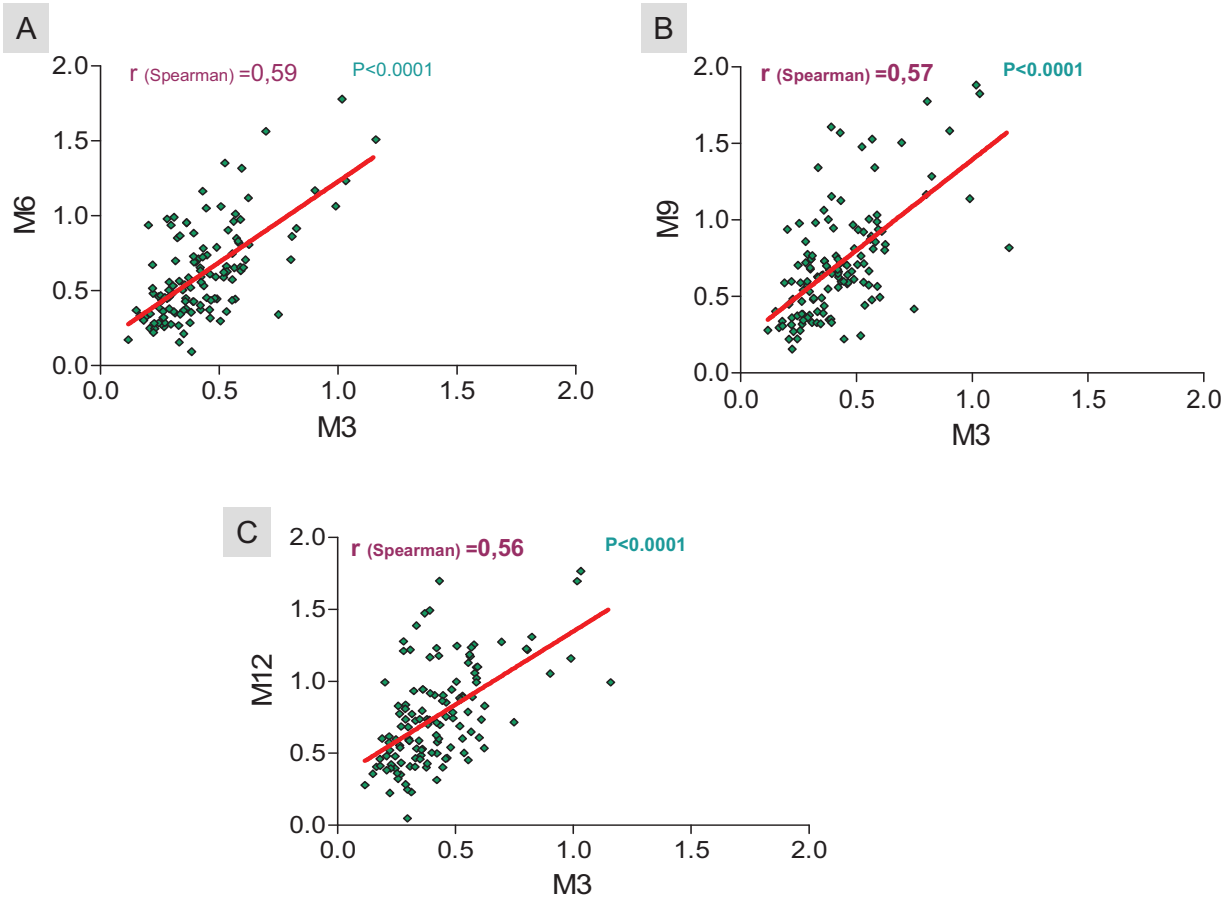


Figure 83 : Corrélation entre les niveaux IgG anti-gSG6-P1 des enfants en M3 et M6 (A), M3 et M9 (B) et M3 et M12 (C)

Les résultats du test de corrélation de Spearman montrent que le taux d'IgG anti-gSG6-P1 des enfants à 3 mois était significativement et positivement associé à ceux qui étaient enregistrés à 6 (r de Spearman=0,59 ; *P<0,0001*), 9 (r de Spearman=0,57 ; *P<0,0001*), et 12 (r de Spearman=0,56 ; *P<0,0001*) mois. Ceci signifie que les variations du taux d'IgG anti-gSG6-P1 des enfants à 3 mois entraînaient, dans le même sens, celles de la réponse IgG anti-gSG6-P1 chez (i) 59% de ces mêmes enfants à 6 mois, (ii) 57% à 9 mois et (iii) 56% à 12 mois. Autrement dit, un enfant avec beaucoup d'IgG spécifiques à 3 mois, aurait plus de change de développer une plus forte réponse IgG spécifique à 6, 9 et 12 mois. Il existerait donc une certaine proportionalité entre le taux d'IgG spécifiques des enfants à 3, 6, 9 et 12 mois.

En résumé

Résultats principaux

- Les enfants de Gankette Balla, exposés aux piqûres d'*An. funestus,* présentaient une réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 issu de la séquence de la protéine gSG6 d'*An. gambiae s. s.*
- Les taux d'IgG spécifiques de ces enfants, faibles en juin, augmentaient en septembre et se stabilisaient en décembre. Cette évolution semblait être associée à celle des taux d'agressivité d'*An. funestus* (données entomologiques d'exposition) et de prévalence de *P. falciparum* chez ces enfants.
- Une réponse Ac IgG anti-gSG6-P1 a été détectée chez des enfants âgés de moins d'un an vivant dans une zone d'hyperendémicité palustre (Sud du Bénin) et exposés, à la fois, aux piqûres d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*. Cette réponse Ac augmentait avec l'âge, de façon significative entre 3 et 6 mois, puis 6 et 9 mois. Entre 9 et 12 mois, la réponse IgG spécifique semblait se stabiliser.
- Les taux d'IgG spécifiques de ces jeunes enfants à 3 mois, bien que faibles, étaient corrélés à ceux de leurs mamans et contenus dans leur cordon ombilical.
- Les taux d'IgG spécifiques du sang des mamans étaient parfaitement corrélés à ceux du sang du cordon ombilical des nouveau-nés
- Les enfants forts répondeurs à l'âge de 3 mois étaient ceux dont leurs mamans avaient significativement les taux d'IgG les plus élevés.
- Les enfants forts et faibles répondeurs à 3 mois restaient, respectivement, forts et faibles répondeurs à 6, 9 et 12 mois. Si bien qu'une association significativement positive entre les taux d'IgG anti-gSG6-P1 à 3 mois et 6, 9 et 12 a été observée.

Interprétation des résultats principaux

- Une séquence proche (91% d'homologie) de celle de gSG6-P1 d'*An. gambiae* a été identifiée dans la salive d'*An. funestus.* Ceci peut justifier la présence d'Ac IgG dirigés contre le gSG6-P1 chez ces enfants exposés aux piqûres d'*An. funestus*.
- La forte agressivité d'*An. funestus* et la prévalence élevée de *P. falciparum* en septembre et décembre sont témoins d'une augmentation du contact Homme-

Vecteur à ces périodes. Ceci peut expliquer le fait que les taux élevés d'IgG soit notés pendant ces périodes comparés à juin.

- L'exposition et du degré de contact Homme-Vecteur augmentent avec l'âge. Le système immunitaire se met en place progressivement au cours des premiers mois de vie expliquant ainsi cette augmentation progressive du taux d'IgG anti-gSG6-P1 entre M3 et M12. Cette mise en place du système immunitaire des jeunes enfants semble être effective entre M9 et M12.
- Une partie des IgG anti-gSG6-P1 des mères exposées semble être transmise aux nouveau-nés via le placenta (cordon ombilical). Et plus le taux d'anticorps spécifiques de la maman est élevé, plus cette transmission materno-fœtale est forte.
- La quantité d'IgG anti-gSG6-P1 transmis à l'enfant par la mère semble renseigner sur le niveau d'exposition et donc sur le risque de transmission du paludisme à l'enfant.

Hypothèses de discussion

- Le gSG6-P1 comme biomarqueur d'exposition à *An. funestus* présente-il la même sensibilité et fiabilité que dans l'évaluation de l'exposition aux piqûres d' *An. gambiae ?* Peut-il servir à évaluer le degré réel de contact entre l'homme et d'autres anophèles vecteurs majeurs du paludisme tels qu'*An. dirus*, *An. darlingi* ou *An. moucheti* ?
- Cette acquisition d'IgG anti-gSG6-P1 des enfants de leurs mamans et des piqûres de moustiques se fait-elle de la même façon quelle que soit l'exposition (fort, moyenne ou faible) individuelle ou collective ? Le réponse immunitaire anti-gSG6-P1 arrive t-il plus vite à maturité chez les enfants plus fortement exposés ? Y'a-t-il pas d'autres voies possible de transmission mère-enfants d'IgG anti-gSG6-P1 (via l'allaitement par exemple) ?
- Quelle peut être la durée des IgG transmis par la maman chez l'enfant ? Quels facteurs sont susceptibles de maintenir les Ac maternels aussi longtemps possibles chez l'enfant ?

- A partir de quel âge peut-on dire que les IgG spécifiques au gSG6-P1 sont un fiable biomarqueur d'exposition et donc initiés par les piqûres (et non issus du transfert d'IgG maternels) ?
- La réponse IgG anti-gSG6-P1 est-elle pertinente comme biomarqueur avant l'âge de 6 mois ?

CHAPITRE X

DISCUSSION GENERALE

Les travaux de cette thèse ont, tout d'abord, abordé la possibilité de doser, par la méthode ELISA, des anticorps IgG spécifiques aux protéines salivaires d'*Anopheles,* à partir de gouttes de sang total récoltées sur papier buvard. Ils ont permis, ensuite, de confirmer, chez des cohortes (enfants et adultes) de l'Angola et du Sénégal, l'étude de la réponse Ac (IgG surtout) spécifique à la salive totale (extraits salivaires totaux) d' *Anopheles gambiae* et au peptide gSG6-P1 (issu de la protéine gSG6 spécifique à la salive d'*An. gambiae*) comme biomarqueur de l'exposition et de valider ce « concept » comme un indicateur d'efficacité de la lutte contre ce vecteur majeur du paludisme en Afrique subsaharienne, et de l'utilisation des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIIs) en particulier. Puis, dans l'optique d'une utililisation majeure (à grande échelle) d'un tel biomarqueur, ces travaux de recherche ont été orientés vers l'application de ce peptide salivaire dans l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité de différentes méthodes de lutte anti-vectorielle dans divers autres contextes épidémiologiques au Sénégal (exposition + LAV) et au Bénin (exposition uniquement), chez toutes les classes d'âge (des nouveau-nés aux adultes). Enfin, nous avons étudié l'effet de certains facteurs de variations (âge, sexe, saison,…) de la réponse immune sur cette réponse Ac anti-salive totale et anti-gSG6-P1 afin de mieux dégager des groupes à haut risque avec un tel biomarqueur et de comprendre les comportements de chaque couche de populations.

X-1- Détection d'IgG spécifiques par ELISA sur des éluats de gouttes de sang total sur papier buvard

L'ensemble des travaux de cette thèse (sauf l'étude Pal-Fleuve au Sénégal) a été mené sur des prélèvements de sang total récoltés sur papiers buvards, une technique de prélèvement sanguin peu utilisée jusqu'ici (Keevil, 2010). Avec ces prélèvements, nous avons dosé, par la méthode ELISA, des anticorps IgG anti-protéines salivaires d'*Anopheles*, même chez des enfants âgés de moins d'un an (nouveau-nés). Les résultats ont montré de fortes variations des taux d'IgG entre individus d'un même ménage, concession ou quartier. Ceci suggère une certaine spécificité de cette réponse IgG anti-protéines salivaires d'*Anopheles* et donc un « effet papier buvard » nul sur elle. Cet « effet papier buvard » consisterait à une absorption des éléments du sang total à analyser (anticorps par exemple) par le papier utilisé et un rôle de l'hématocrite défavorable à leur élution (Keevil, 2010). Ceci ne semble pas être le cas dans les études de cette thèse du fait de la forte spécificité des réponses individuelles observée. D'ailleurs, cette forte spécificité confirme les travaux récents faits en République Démocratique du Congo (Hasker *et al.*, 2010) où il a été montré que la technique de détection

d'Ac anti-*Trypanosoma b. gambiense* dans des prélèvements sang sur papier buvard et que cette technique était aussi fiable (bonnes sensibilité et spécificité) que les méthodes standards de diagnostic trypanique (test d'agglutination par l'utilisation de microcartes). Ces travaux suggèrent aussi que le sang total collecté et séché sur papier buvard est une alternative commode et fiable à la lourdeur des méthodes d'échantillonnage classiques utilisées pour les études séro-épidémiologiques. Ceci vient conforter les travaux de De Carvalho *et al* (De Carvalho *et al.*, 1992) qui avaient rapporté une bonne corrélation entre les taux d'IgG anti-*P. falciparum,* détectés par ELISA et immunofluorescence indirecte, dans des éluats de sang sur papier filtre et ceux des sérums des mêmes individus. Ces auteurs ont aussi rapporté une bonne concordance entre les résultats de ces 2 techniques (ELISA et immunofluorescence indirecte). De plus, le prélèvement du sang des capillaires du bout du doigt après ponction de cette dernière fait que cette technique d'échantillonnage soit plus rapide, plus acceptable par les populations et demande moins d'expertise que la ponction veineuse (Rawat *et al.*, 2001). Cette technique de prélèvement est aussi plus facile et plus sûre (Condorelli *et al.*, 1994). En plus, elle pourrait régler le problème particulier des prélèvements sanguins chez les petits enfants et les nouveau-nés et simplifier les études immuno-épidémiologiques et vaccinales à grande échelle (Roy *et al.*, 1997). D'autant plus qu'elle permet de rassembler et de transporter de nombreux échantillons à la fois et de réduire le coût lié au prélèvement et à leur transport. Cette technique permet de faire plusieurs analyses moléculaires (séquençage de l'ADN des organismes vivants, techniques modernes de diagnostic basées sur la détection de biomarqueurs …) sur un même échantillon et est adaptée donc aux études pluridisciplinaires à grande échelle (Pomelova and Osin, 2007).

Cette technique de prélèvement, comme le montrent les travaux de cette thèse, semble être particulièrement adaptée aux études de terrain sur le paludisme. Elle permet, en même temps, la réalisation de gouttes épaisses pour l'identification plasmodiale et de gouttes de sang total sur papiers buvards pour le dosage d'Ac. Cependant, une différence de concentration de certains constituants dans le sang veineux et le sang capillaire peut être notée, par exemple le sang capillaire est 5% plus concentré en albumine et 24% moins concentré en urée que le sang veineux (Woods *et al.*, 2004). D'où l'importance de la validation de la technique de prélèvement du sang capillaire sur papier buvard avant de l'appliquer aux études épidémiologiques (Keevil, 2010). Des problèmes de quantification et de standardisation des gouttes récoltées sur papier buvard sont souvent rencontrés avec cette technique de prélèvement (Keevil, 2010). En effet, la taille des gouttes de sang peut varier d'un individu à l'autre, sous l'effet de plusieurs facteurs dépendant de l'individu prélevé ou de

celui qui prélève (infirmier). Pour limiter ce type de biais, nous avons utilisé des poiçons de même diamètre (1mm) pour découper et de calibrer (standardiser) ainsi les prélèvements sanguins sur papiers buvards.

X-2- Réponse anticorps (IgG) anti-protéines salivaires comme Biomarqueur d'exposition

Biomarqueur d'exposition à *Anopheles*

De précédents travaux, menés en zone rurale sénégalaise de transmission mésoendémique, avaient montré que les réponses IgG anti-salive totale d'*An. gambiae* (Remoue *et al.*, 2006) et anti-gSG6-P1 (Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2008a) pouvaient servir comme biomarqueur mesurant l'exposition d'enfants de moins de 5 ans aux piqûres d'*Anopheles*. Dans cette thèse, nous avons confirmé ces résultats dans d'autres contextes épidémiologiques en Angola (transmission faible, milieu semi-urbain) et au Sénégal (transmission faible, milieu urbain) et chez toutes les tranches d'âge (des très jeunes enfants aux adultes).

En 2005 (avant mise en place des MIIs), les niveaux de réponse IgG spécifiques à la salive totale et à gSG6-P1 chez les individus de la cohorte angolaise ont montré d'importantes variations saisonnières, avec de considérables pics en mai (pleine période pluvieuse) et en octobre (moins marqué). Le pic d'IgG de mai faisait suite aux fortes pluies de mars-avril, mois les plus pluvieux de l'année dans cette zone et celui d'octobre aux 1ères pluies. Nous avons aussi constaté une bonne corrélation des réponses IgG (anti-salive et anti-gSG6-P1) et les données entomologiques et parasitologiques. Si bien que les pics de réponse IgG spécifiques étaient associés à ceux des densités moyennes d'*An. gambiae s. s.* et de la parasitémie (intensité moyenne des infections à *P. falciparum*, donc de la transmission). Cet effet « saison » sur la réponse IgG peut être donc dû aux nombreuses piqûres (infectantes et majoritairement non infectantes) reçues en période pluvieuse, du fait d'une forte exposition aux fortes densités d'anophèles, d'où le pic de parasitémie (densité et prévalence parasitaires) noté. En effet, comme le montrent les données entomologiques, les densités annophéliennes sont maximales au cours de la saison des pluies, période au cours de laquelle la température et l'hygrométrie deviennent propices au développement d'espèces de moustiques du genre *Anopheles*, telle qu'*An. gambiae s. s*. Cette dernière, en règle avec sa biologie, vit préférentiellement dans les eaux peu profondes, non polluées, ensoleillées et donc temporaires ; conditions facilement réalisables en saison pluvieuse, dans un contexte de savane tropicale. Cet effet saison a été aussi noté chez les populations de la région de Dakar,

en contexte de paludisme urbain. En effet, les individus (enfants et adultes) des quartiers prélevés du début octobre à la mi-novembre (1ère moitié de l'étude) avaient un taux d'IgG anti-gSG6-P1 médian significativement plus élevé que celui des individus prélevés après la mi-novembre (mi-novembre – fin décembre = 2ème moitié). Ceci s'explique par la baisse des densités et de l'agressivité d'*An. gambiae s. l.*, seul vecteur assurant la transmission du paludisme dans la zone. En effet, les dernières pluies de l'hivernage 2008 étaient enregistrées à la mi-octobre, d'où la diminution des gîtes larvaires et des densités anophéliennes un mois plus tard. Chez cette même cohorte dakaroise, d'importantes variations de la proportion d'individus répondeurs et du niveau médian d'IgG anti-gSG6-P1 d'un quartier à un autre, suggérant que le degré de contact homme-vecteur était différent malgré le fait que « l'effet quartier » ait été tenu en compte. Cette hétérogénéité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 était aussi positivement associée à celle de l'agressivité d'*An. gambiae s.l.* entre quartiers. Des différences d'âge peuvent cependant l'expliquer puisque la probabilité du contact entre les populations et les vecteurs augmente avec l'âge de ces premiers (Drakeley *et al.*, 2005). Cependant, dans cette étude, les variations de l'âge moyen des enfants entre les quartiers n'étaient pas significatives. Ceci veut dire que les différences de degré de contact homme-vecteur observées entre enfants de quartiers différents ne sont pas dues à une hétérogénéité de l'âge. Il en est de même pour les adultes même si des différences significatives ont été observées entre 3 des 16 quartiers. De plus, en Angola, les individus infectés par *P. falciparum* présentaient des nivaux de réponses IgG anti-salive plus élevés que ceux qui n'étaient pas infectés. Tout ceci veut dire que l'étude de la réponse IgG spécifique aux antigènes salivaires d'*An. gambiae* peut permettre de distinguer les individus fortement piqués par ce vecteur (infecté ou non) de ceux qui ne sont pas ou sont peu piqués. Les réponses IgG spécifiques à la salive totale et au peptide gSG6-P1 d'*An. gambiae* peuvent donc être des marqueurs biologiques permettant de mesurer l'exposition aux piqûres (infectantes et non infectantes) d'*An. gambiae* et le risque de transmission de *P. falciparum* dans divers contextes épidémiologiques. Ces conclusions confirment ainsi celles de précédents travaux menés en Thaïlande, en Amazonie (Brésil) et au Sénégal. En effet, des réponses IgG (réponse majeure) et IgM contre les protéines des glandes salivaires d'*Anopheles dirus* ont été rapportées chez des adultes thaïlandais exposés aux piqûres de ce vecteur (Waitayakul *et al.*, 2006). Ces réponses IgG et IgM étaient i) très fortes chez les individus infectés par *P. falciparum* et *P. vivax*, ii) moins fortes chez les individus non infectés vivant dans la même zone endémique et iii) très faibles ou nulles chez d'autres résidants dans une zone sans paludisme. En Amazonie (Au Brésil), en plus d'être un biomarqueur de l'infection par *P. vivax* comme en Thaïlande,

cette réponse anticorps anti-salive peut servir de biomarqueur de sévérité de la maladie. En effet, (i) des adultes volontaires naturellement infectés par *P. vivax* présentaient des taux d'anticorps anti-salive totale d'*An. darlingi* plus élevés que ceux qui étaient non infectés et (ii) parmi les infectés, les asymptomatiques présentaient des taux d'Ac anti-salive d'*An. darlingi* plus élevés et un rapport IFN-γ/IL-10 plus faible que les porteurs symptomatiques (Andrade *et al.*, 2009). Les résultats obtenus sur des enfants de 0 à 5 ans vivant dans des villages du Sénégal indiquaient une augmentation des réponses IgG anti-salive positivement associée au niveau d'exposition à la piqûre d'*An. gambiae* (Remoue *et al.*, 2006). De plus, ces auteurs ont rapporté que cette réponse Ac spécifique à la salive serait prédictive d'une morbidité palustre. En effet, en septembre (début de suivi), les enfants qui avaient développé un accès palustre dans les trois mois après leur prélèvement, présentaient une réponse IgG anti-salive totale plus élevée que celle de ceux qui n'allaient pas faire d'accès palustre (Remoue *et al.*, 2006). Comme nous l'avons montré dans cette, un effet saison sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 a été décrit chez cette cohorte rurale d'enfants sénégalais (Poinsignon *et al.*, 2009). Mais l'intérêt des études de cette thèse, couvrant enfants et adultes à la fois, est qu'elle montre qu'un tel marqueur d'exposition, de risque de transmission est applicable aussi bien aux enfants qu'aux adultes à la fois et surtout dans divers contextes épidémiologiques (rural, semi-urbain et urbain) différents par leur composantes vectorielle, environnementtale et climatique.

Salive totale d'*An. gambiae* et gSG6-P1 pour l'évaluation de l'exposition individuelle

En complément à cette approche à l'échelle de la population, nous avons constaté une variabilité des réponses IgG anti-salive (en Angola) et anti-gSG6-P1 (en Angola et au Sénégal), acquises sous l'effet des piqûres d'*Anopheles,* entre individus du même ménage, du même quartier ou de quartiers différents bien que la transmission et l'exposition aux vecteurs anophèles étant globalement connues comme faibles dans ces zones. Ceci veut dire qu'il existe une grande hétérogénéité individuelle du contact Homme-*Anopheles*. D'autres facteurs propres à l'individu (facteurs génétiques, histoire d'exposition ou d'infection unique ou multiple, existence de co-infection…) peuvent aussi expliquer en partie cette hétérogénéité individuelle de la réponse IgG spécifique. Dans tous les cas, la technique de dosage d'Ac anti-salive totale et protéines spécifiques (gSG6) d'*Anopheles,* grâce à sa forte sensibilité, du fait de son fort système amplificateur, permet de mettre en évidence cette hétérogénéité, même chez les individus ayant reçu ne quantité très faible de piqûres d'anophèles. La réponse IgG spécifique à la salive totale d'anophèles ou au peptide gSG6-P1 peut servir à évaluer le degré

réel de contact Homme-Vecteur et donc le degré d'exposition individuelle et son hétérogénéité chez des individus vivant dans des zones de faible densité anophélienne. Ces conclusions confirment celles des travaux qui ont été menés au Sénégal (Poinsignon *et al.*, 2009; Remoue *et al.*, 2006) et en Thaïlande(Waitayakul *et al.*, 2006). Cette hétérogénéité individuelle de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1 a été notée même chez les très jeunes enfants (nouveau-nés de moins d'un an) de la cohorte du Sud du Bénin. Elle peut être expliqué par l'existence de facteurs ou comportements spécifiques à l'individu (ou au ménage) favorisant son contact avec le vecteur (Robert and Boudin, 2003). L'utilisation de stratégies de lutte anti-vectorielle dépendante d'autres facteurs (niveau socio-économique, d'éducation… de l'individu ou des chefs du ménage) (Geissbuhler *et al.*, 2007) et les mouvements des populations urbaines vers les zones rurales où l'exposition aux piqûres des anophèles est plus forte (Robert *et al.*, 2003) peuvent, par exemple, expliquer cette hétérogénéité individuelle de la réponse IgG anti-protéines salivaires. Un comportement chez le vecteur peut aussi la favoriser. En effet, en contexte de faible exposition, les quelques anophèles présents ont tendance, après un repas sanguin, à retourner ou à rester dans le même site pour d'autres repas sanguins (McCall *et al.*, 2001).

Le peptide gSG6-P1 plus pertinent que la salive totale comme biomarqueur ?

En Angola, l'évolution saisonnière des niveaux d'IgG médians et individuels et la bonne corrélation entre les taux médians d'IgG et les données entomologiques et la parasitémie étaient similaires aussi bien avec la salive totale d'*An. gambiae* non infectée qu'avec le peptide gSG6-P1. Ceci suggère que ce peptide peut mimer les effets immunologiques (production d'anticorps) des éléments antigéniques (y compris protéines et peptides) de la salive totale non infectée d'*An. gambiae*. Cette observation n'est toutefois pas étonnante puisque la protéine gSG6 (dont est issu ce peptide) a été décrite comme étant très antigénique (Poinsignon *et al.*, 2008a) et secrétée en grande quantité au moment du repas sanguin d'un anophèle femelle infecté ou non (Arca *et al.*, 2005). De plus, ce peptide était la partie la plus antigénique de la protéine gSG6 (Poinsignon *et al.*, 2008a). Des observations similaires ont été faites avec un autre système hôte-vecteur. En effet, il a été montré que le Maxidilan (peptide) de la salive de *Lu. longipalpis* pouvait induire les mêmes effets immunomodulateurs (Lanzaro *et al.*, 1999; Soares *et al.*, 1998) et immunoprotecteurs (Milleron *et al.*, 2004b) contre les leishmanies des extraits salivaires totaux du phlébotome *Lu. longipalpis*.

Le peptide gSG6-P1 était-il plus pertinent que la salive totale comme biomarqueur d'exposition ? Une analyse plus poussée des résultats nous a permis de constater que les

observations (l'évolution saisonnière et cette corrélation) discutées précédemment étaient plus nettes et plus marquées avec le peptide gSG6-P1 qu'avec la salive totale. En effet, la variabilité inter-individuelle du taux d'IgG était beaucoup plus forte avec le peptide gSG6-P1 qu'avec la salive totale. Malgré ceci, les variations saisonnières des niveaux médians d'IgG étaient exacerbées et plus associées à celles de la parasitémie et du degré d'exposition aux piqûres avec le gSG6-P1 qu'avec la salive totale. En janvier 2006, par exemple, un « petit » pic (significatif par rapport à décembre) de réponse IgG a été observé avec la salive totale, alors que la parasitémie et les densités anophéliennes moyennes étaient faibles et comparables à celles observées en décembre 2005 (mois précédent). Avec le gSG6-P1, ce pic de janvier avait disparu, si bien que le niveau d'IgG médian et les profiles individuels n'étaient pas significativement différents de ceux observés en décembre. Tout ceci suggère que le peptide gSG6-P1 évalue de façon plus nette et précise l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* que la salive totale. Cette dernière à tendance à sousestimer ou à surestimer le degré d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae.* Ceci peut être du à un manque de spécificité de la salive totale aux moustiques *Anopheles*. En effet, la salive totale est constituée d'un panel de molécules de nature et fonctions biochimiques très diverses et différentes. Certaines de ces molécules sont spécifiques à l'espèce, le genre ou la famille alors que d'autres peuvent être communes à plusieurs espèces, genres, familles de moustiques, voire autres groupes apparentés d'arthropodes (Francischetti *et al.*, 2009, Ribeiro, 1995). Or, les résultats entomologiques ont rapporté la présence d'autres genres de moustiques : des *Culex* surtout, des *Mansonia* et des *Aedes*. Une partie de la réponse IgG supposée être spécifique à la salive d'*Anopheles* pourrait donc être due à des antigènes salivaires de *Culex*, *Mansonia* ou *Aedes* ou à des épitopes d'autres organismes vivants (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1997a; Jeon *et al.*, 2001). Ceci peut expliquer le pic de réponse IgG anti-salive noté en janvier (avant MIIs) malgré la faiblesse de la parasitémie et des densités d'*An. gambiae*. Cependant, de récents travaux ont montré que cette réaction immunologique croisée semblait très faible ou inexistante (Remoue *et al.*, 2006; Waitayakul *et al.*, 2006). De plus, cette hypothèse d'existence de cross-réactivité ne semble pas à elle seule expliquée la persistance de la réponse IgG anti-salive en saison sèche (Juillet, Août, Septembre) puisqu'une réponse IgG anti-gSG6-P1 spécifique assez forte, témoin de piqûres d'*Anopheles*, a été aussi notée durant cette période. D'ailleurs, cette dernière interprétation est confortée par l'observation de gîtes potentiels d'*An. gambiae* soulevant ainsi des problèmes socio-économiques et micro-écologiques comme l'ont rapportée les enquêtes entomologiques (Toto et al., données non publiées).

Cette comparaison entre salive totale et gSG6-P1 a donc confirmé l'applicabilité de l'étude de la réponse IgG anti-salive totale d'*An. gambiae* comme marqueur biologique de l'exposition individuelle ou collective aux piqûres d'*An. gambiae*. Elle montre cependant que la pertinence d'un tel outil serait discutable en raison du manque de spécificité des composantes de la salive totale d'*Anopheles.* Il s'y ajoute que la production de la salive en quantité suffisamment utilisable pour les études épidémiologiques est laborieuse et coûteuse (Poinsignon *et al.*, 2008a). De plus, la composition de la salive totale peut varier sous l'effet de facteurs écologiques tels que l'âge, l'état d'engorgement (gorgés ou pas gorgés) ou le statut infectieux des anophèles (Ribeiro and Francischetti, 2003), pouvant modifier la réponse IgG anti-salive et donc la mesure de l'exposition. Enfin, elle rapporte que le peptide gSG6-P1 apporterait plus de sensibilité et de spécificité à cette technique d'évaluation de l'exposition avec moins de limites de production.

Le peptide gSG6-P1, plus pertinent que les méthodes entomologiques pour évaluer l'hétérogénéité de l'exposition aux faibles densités d'*Anopheles* ?

Dans la région de Dakar (étude Actu-Palu), les profiles des réponses IgG anti-gSG6-P1 des 45 quartiers étudiés ont montré une forte hétérogénéité, associée positivement à celle de l'agressivité d'*An. gambiae s. l.* Cette dernière est déterminée, en milieu urbain, principalement par la densité des populations d'*An. gambiae*, leur comportement de piqûre (endophagie/exophagie) et par la disponibilité des hôtes humains. La densité des populations anophéliennes est conditionnée en grande partie par la diversité (en nombre et en productivité) des gîtes larvaires, soumises à l'influence de facteurs environnementaux naturels et anthropiques locaux, et les caractéristiques des habitations (Machault *et al.*, 2009; Matthys *et al.*, 2006a; Matthys *et al.*, 2006b; Pages *et al.*, 2008). En milieu urbain, la plupart des gîtes larvaires sont très localisées, ce qui favorise une hétérogénéité des densités de vecteurs et de la transmission du paludisme (Keiser *et al.*, 2004). Le caractère endophagique des populations de vecteurs en milieu urbain semble être très particulier, car étant très spécifique aux conditions locales (Geissbuhler *et al.*, 2007; Pages *et al.*, 2008); ce qui a aussi tendance à favoriser l'hétérogénéité de l'agressivité des anophèles vecteurs et du risque de paludisme. Une récente étude a montré que les populations d'*An. gambiae s. l.* de Dakar avaient une grande capacité d'adaptation aux conditions locales (même aux eaux polluées) et un très faible pouvoir dispersif (300 m maximum de leur gîtes larvaires) du fait de la forte densité et de la hauteur des habitations et de la grande disponibilité des hôtes (forte densité de la population humaine) (Machault *et al.*, 2009). De ce fait, chaque zone (quartier ou district)

pouvait présenter une ou des populations de vecteurs caractéristiques qui lui sont plus ou moins spécifiques, expliquant ainsi l'hétérogénéité de l'agressivité et donc du contact des *An. gambiae* avec leurs hôtes, d'où la forte variabilité des réponses IgG anti-gSG-P1 entre quartiers. L'existence de pratiques agricoles peut aussi expliquer la forte agressivité d'*An. gambiae* dans certains quartiers, même si nous ne nous sommes pas intéressés à ce facteur dans cette étude. Cependant, des études (Machault *et al.*, 2009; Pages *et al.*, 2008) ont rapporté l'existence de pratiques agricoles et de jardinage dans les zones de Hann-Yarakh et de Pikine où nous avons noté de fortes réponses IgG anti-gSG6-P1. Le phénomène d'irrigation semblait être inexistante dans cette la région dakaroise contrairement à aux observations faites en milieu urbain ivoirien (Matthys *et al.*, 2006a) et ghanéen (Afrane *et al.*, 2004).

Cependant, les résultats de cette étude ont montré que l'agressivité d'*An. gambiae* n'était pas le seul facteur explicatif de la réponse IgG spécifique à gSG6-P1, puisque la proportion de répondeurs et l'intensité de réponse IgG étaient plus faibles dans certains quartiers à forte agressivité (Arouna Sall) que dans d'autres (Ngaraf, Biscuiterie, Yoff Dagoudane) à taux agressivité très faibles. De plus, les résultats des corrélations ont montré que l'agressivité d'*An. gambiae* ne permettaient d'expliquer au maximum que 52 et 54% des variations de la proportion d'individus répondeurs et du niveau médian d'IgG anti-gSG6-P1 spécifiques, respectivement. Ceci peut être du aux limites de sensibilité de la méthode de capture entomologique utilisée, étant donné le contexte de faibles densités d'*An. gambiae* (Smith *et al.*, 2005). Des interventions visant à réduire ou à empêcher le contact homme-vecteur (Geissbuhler *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009), très fréquentes en Afrique subsaharienne suite à la multiplication des programmes nationaux de lutte antipaludique, peuvent aussi concourir à expliquer cette corrélation « moyenne » entre résultats IgG anti-gSG6-P1 et les taux d'agressivité des anophèles. Parmi ces outils de lutte antivectorielle, la moustiquaire reste le plus efficace (Greenwood *et al.*, 2005; Lengeler, 2004). Dans la région de Dakar, des enquêtes menées durant l'hivernage 2008 ont rapporté que 16,6% de la population générale avait dormi sous moustiquaire la veille du passage des enquêteurs (PNLP-Sénégal, 2009), malgré la faiblesse de la transmission et de l'exposition aux vecteurs *Anopheles* (mais aussi des *Aedes*, surtout des *Culex* et autres moustiques). Cette utilisation était différente entre quartiers ou ménages d'un même quartier du fait d'une appréhension différente que les populations ont vis-à-vis du paludisme et de la moustiquaire (Worrall *et al.*, 2005). Elle explique ainsi la faiblesse des réponses IgG chez les individus de certains quartiers (Arouna Sall par exemple) malgré la présence des *An. gambiae* assez agressifs. Une utilisation très fréquente dans les

villes urbaines de l'Afrique subsaharienne d'autres moyens de lutte (serpentins fumigènes, bombes aérosols, répulsifs, ventilateurs et climatiseurs…) a été observée (Doannio *et al.*, 2006). Cette utilisation peut être différente entre les quartiers, ce qui pourrait aussi concourir à expliquer les variations de réponses IgG spécifiques. De plus, la proportion d'individus répondeurs et le taux médian d'IgG anti-gSG6-P1 permettaient de mieux distinguer les différences entre groupes d'exposition que le taux d'agressivité d'*An. gambiae*. En effet, avec ces paramètres immunologiques, une différente très significative entre les trois groupes d'exposition urbaine (faible, moyenne ou forte), pris deux à deux, a été observée. Alors que seul le groupe de forte exposition était significativement différent des deux autres (faible et moyenne exposition) en termes d'agressivité d'*An. gambiae.* Tout ceci veut dire que les données de réponses IgG spécifiques, en permettant une mesure précise du contact réel Homme-Vecteur, évalueraient mieux l'hétérogénéité du degré d'exposition aux piqûres des anophèles et de risque de paludisme en milieu urbain que le taux d'agressivité d'*An. gambiae.* Ce dernier a été calculé à partir des captures sur hommes, la meilleure méthode entomologique d'évaluation de l'exposition, mais qui n'est pas sans limite dans des conditions de faible densité des anophèles. De plus, les populations d'anophèles urbains ont souvent un comportement exophile et exophage du fait probablement de la forte utilisation des moyens de lutte (Geissbuhler *et al.*, 2007; Oyewole and Awolola, 2006), ce qui peut multiplier les biais rencontrés dans leur capture sur hommes. Ces travaux confortent ainsi l'hypothèse de l'existence d'autres facteurs jouant un rôle non négligeable dans les variations spatiales et temporelles du contact Homme-*Anopheles* entre quartiers ou sites différents. Le peptide gSG6-P1 semble tenir compte de ces autres facteurs mis en jeu, même en zone de faible exposition, contrairement au taux d'agressivité entomologique. Ce peptide peut être, de ce fait, un outil pertinent de l'évaluation épidémiologique du risque de paludisme durant les périodes et dans les zones de très faible exposition et transmission (altitude, saison sèche en zone tropicale, zones côtières et urbaines…). Cependant, il serait aussi intéressant de disposer des données de prévalences et densités parasitaires pendant cette période dans ces différentes zones d'études, même si elles peuvent montrer des limites (Beier *et al.*, 1999) du fait de la faiblesse de la transmission dans la zone (Machault *et al.*, 2009). Ceci soulève aussi l'intérêt d'identifier et de localiser par les Systèmes d'Informations Géographiques (SIG) les foyers concernés pour y planifier en priorité les actions de lutte anti-vectorielle contre les larves (bio-larvicides, régulateurs de croissance) et les adultes (moustiquaires imprégnées, aspersions intra-domiciliaires).

Le peptide gSG6-P1 pour évaluer l'exposition aux autres anophèles vecteurs : l'exemple d'*An. funestus*

Nous avons aussi rapporté de considérables variations, en fonction de la saison, des réponses IgG anti-gSG-P1 individuelles et médianes chez des enfants exposés aux piqûres d'*An. funestus* à Gankette Balla (au bord du lac de Guiers, Nord du Sénégal). En effet, les taux d'IgG anti-gSG6-P1 étaient faibles en juin (début saison pluvieuse), atteignent leur maximum en septembre (milieu saison pluvieuse) et baissent en décembre. Ces variations des taux d'IgG anti-gSG6-P1 étaient associées positivement à celles du taux d'agressivité d'*An. funestus* capturés dans le village et de la prévalence de *P. falciparum* moyenne chez ces enfants. Des réponses IgG anti-gSG6-P1 spécifiques ont été détectées chez des enfants âgés de moins d'un an du Sud du Bénin où ils étaient fortement exposés aux piqûres d'*An. gambiae* et *An. funestus* à la fois. Ces résultats suggèrent donc que le peptide gSG6-P1 pourrait permettre d'évaluer à la fois l'exposition aux piqûres infectantes et non infectantes d'*An. gambiae* et d'*An. funestus*, un autre vecteur majeur du paludisme en Afrique subsaharienne. Autrement dit, la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 (issu de la protéine gSG6 décrite chez *An. gambiae* pour la 1ère fois) peut être un biomarqueur épidémiologique permettant aussi de mesurer l'exposition aux piqûres d'*An. funestus* et le risque de transmission de *P. falciparum* par ce vecteur. En effet, la protéine gSG6 dont est issu le peptide gSG6-P1 a été décrite dans le sialome de plusieurs autres espèces d'anophèles, y compris *An. funestus*. Le peptide gSG6-P1, une des séquences de la protéine gSG6 la plus conservée d'une espèce à une autre, présente 91% d'identité avec la séquence correspondante d'*An. funestus* (fGS6-P1) (Poinsignon *et al.*, 2008a). Ces 2 séquences diffèrent que par la substitution de l'asparagine (position 9) et de la leucine (position 15) de gSG6-P1 *d'An. gambiae* par respectivement la glutamine et l'isoleucine dans la séquence de fGS6-P1 d'*An. funestus.* Cette forte homologie entre les 2 séquences peptides de ces 2 espèces explique que les individus exposés à *An. funestus* présentent une forte réponse IgG contre le peptide gSG6-P1 d'*An. gambiae.* Cependant, les données entomologiques (Dia *et al.*, 2008) ont montré la faible présence d'*An. arabiensis* (une espèce du complexe *An. gambiae*) en septembre dans ce village. Or, il a été montré dans cette thèse et par d'autres travaux (Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2008a) que les individus, même faiblement exposés aux piqûres d'*An. arabiensis,* présentaient des niveaux IgG anti-gSG6-P1 élevés. Donc nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse selon laquelle une partie de ces IgG serait due aux piqûres d'*An. arabiensis* même si le fait que les taux d'IgG spécifiques soit élevés en décembre (où *An. arabiensis* n'a pas été capturé) suggère le contraire. La mise en place d'un biomarqueur

d'exposition commun aux 2 vecteurs majeurs (*An. gambiae* et *An. funestus*) du paludisme en Afrique tropicale et intertropicale s'avère particulièrement intéressante et utile puisque la plupart des populations de cette région se trouvent exposer à la fois ou successivement aux piqûres de ces 2 vecteurs à très forte capacité vectorielle. Il serait aussi intéressant de tester ce peptide dans l'évaluation de l'exposition à d'autres vecteurs du paludisme d'Afrique tropicale (*An. melas*, *An. nili* et *An. moucheti*), d'Amérique du Sud (*An. darlingi*) et d'Asie du Sud-Est (*An. stephensi*, *An. dirus*…) afin de mettre en place un biomarqueur commun à tous les vecteurs *Anopheles*. D'autant plus que dans une région, plusieurs vecteurs (principaux et sécondaires) peuvent vivre en sympatrie.

Cependant, de récentes études menées dans notre groupe ont montré qu'il serait possible et pertinent de mettre en place des biomarqueurs d'exposition spécifiques à chaque espèce. En effet, des travaux ont montré que des enfants exposés à la fois aux piqûres d'*An. gambiae* et d'*An. funestus* présentaient des Ac spécifiques à des protéines immunogéniques communes et spécifiques à chaque espèce (Cornelie et al., données non publiées). Voilà, donc, une autre piste intéressante de recherche sur les protéines/peptides « salivaires » comme biomarqueurs surtout pour la détermination de l'espèce ou même la forme moléculaire qui pique l'homme ou assure l'essentiel de la transmission dans une zone donnée.

X-3- Acquisition et facteurs de variations de la réponse IgG anti-gSG6-P1

Acquisition de la réponse IgG anti-gSG6-P1

Nous avons montré chez des jeunes enfants de Tori Bossito (Sud du Bénin), zone d'hyperendémie palustre, avec *An. gambiae* et *An. funestus* comme principaux vecteurs, que le taux d'IgG anti-gSG6-P1 augmente avec l'âge. En effet, le niveau médian d'anticorps IgG, qui était faible à 3 mois après la naissance, augmente de façon significative entre 3 et 6 mois puis 6 et 9 mois. Ceci suggère que l'acquisition de la réponse IgG anti-gSG6-P1 se fait progressivement avec la mise en place et le développement du système immunitaire de l'enfant durant la première année de vie. Ce fait semble être compréhensible puisqu'un très jeune enfant est dit naïf à la naissance. Son système immunitaire (pas encore ou peu développé) n'est pas encore suffisamment stimulé par des antigènes salivaires d'*Anopheles* du fait de la faible exposition. En plus, le nouveau-né bénéficie d'une grande protection contre les piqûres de ces moustiques (MIIs, son corps est souvent couvert, protection par la mère…). Cependant, l'augmentation du niveau de réponse IgG anti-gSG6-P1 médiane n'était pas

significative entre 9 et 12 mois, suggérant que cette mise en place du système immunitaire des jeunes enfants serait effective durant cette période (entre 9 et 12 mois), même si une exposition moins forte de ces enfants aux piqûres des moustiques, à 12 mois, pourrait expliquer cette observation. Par ailleurs, lors de la vie utérine, contrairement aux IgM et aux IgA, les IgG peuvent être transférés de la mère à l'enfant par des mécanismes de transcytose à travers les barrières épithéliales (Saji *et al.*, 1999) à partir de la deuxième moitié du second semestre de grossesse (Gitlin and Boesman, 1966). Ces anticorps maternels constituent la forme primaire des défenses immunitaires de type humoral du nouveau-né. Cette réponse humorale est temporaire, les anticorps maternels sont progressivement éliminés selon le métabolisme classique des IgG et l'immunité maternelle peut durer jusqu'à 24 semaines. Les résultats de notre étude confirment ces observations puisqu'une positive corrélation a été observée entre (i) les taux d'IgG dans le sang circulant des mères de ces enfants et ceux du sang de leur cordon ombilical et (ii) les taux d'IgG des enfants à 3 mois et ceux du sang de leur cordon ombilical. De plus, la quantité d'IgG anti-gSG6-P1 transmise de la mère à l'enfant semble dépendre du niveau d'exposition de la mère aux piqûres des anophèles comme le montrent les résultats. En effet, à l'âge de 3 mois, les enfants forts répondeurs étaient ceux dont leurs mamans avaient les plus forts taux d'IgG avant l'accouchement. Cette transmission d'IgG anti-gSG6-P1 de la maman à l'enfant pouvait aussi se faire via le lait maternel. En effet, les enfants forts et faibles répondeurs à 3 mois étaient restés, respectivement, forts et faibles répondeurs jusqu'à 12 mois (à 6, 9 et 12 mois). Ce résultat peut cependant être du à une exposition plus forte aux piqûres d'anophèles des enfants forts répondeurs, d'autant plus que leurs mères étaient plus exposées que celles des enfants faibles répondeurs. Toutes ces observations montrent que pour mieux mettre en évidence l'acquisition d'une réponse spécifique au peptide gSG6-P1 sous l'effet des piqûres d'anophèles. Par ailleurs, il serait indispensable d'étudier la réponse IgM dirigée contre ce peptide. En effet, le nouveau-né peut produire des IgM suite à une primo-exposition et ces IgM ne peuvent pas être transférés à l'enfant par sa mère puisque ce sont des anticorps polyclonaux incapables de traverser les barrières épithéliales (Saji *et al.*, 1999). De plus, une étude préliminaire (Poinsignon A. *et al.,* données non publiées) a montré que le profil de la réponse IgM observé chez des enfants de 2-25 mois vivant en zone rurale sénégalaise (village de Ndiop) semblait caractéristique d'une acquisition progressive suite aux expositions répétées aux piqûres d'anophèles, puisqu'à leur naissance, ces enfants ne présentaient pas d'IgM anti-gSG6-P1 qu'ils développaient progressivement. Ainsi, dès l'âge de 7 mois un jeune enfant pouvait développer une réponse IgM spécifique à gSG6-P1, indiquant qu'un enfant de cet âge

pouvait être exposé aux piqûres d'*Anopheles.* Les résultats de notre étude semblent indiquer cependant une production d'IgG par ces enfants à 6 mois. Ceci veut dire, vu le schéma classique de la réponse humorale (réponse IgM primaire d'abord, réponse IgG secondaire ensuite), qu'une production d'IgM anti-gSG6-P1 est envisageable entre 3 et 6 mois. Cette différence d'acquisition de réponse IgG et IgM anti-gSG6-P1 entre ces 2 études (l'étude préliminaire de Poinsignon et al. et notre étude) peut être due à une exposition à *Anopheles* différente*,* cette étude ayant été menée en zone d'hyperendémie et l'étude de Poinsignon *et al.,* en zone de mésoendémie palustre. Néanmoins, il serait intéressant d'annalyse les résultats des dosages d'IgM anti-gSG6-P1 de cette cohorte de jeunes enfants de Tori Bossito qui sont en cours dans notre laboratoire.

Par ailleurs ces résultats nous permettent de dire qu'il est possible de détecter par Elisa des Ac IgG ou IgM anti-gSG6-P1 même chez des enfants âgés de moins d'un an, signifiant que ce peptide peut être un biomarqueur d'exposition de très faible exposition aux piqûres d'*Anopheles* chez les très jeunes enfants.

Facteurs de variations de la réponse anticorps IgG anti-gSG6-P1

En Angola, les niveaux médians d'IgG anti-gSG6-P1 en fonction de l'âge (3 classes d'âge) n'ont montré de différences significatives qu'au niveau des pics d'exposition d'octobre et de mai 2005. En effet, durant ces périodes, les niveaux d'IgG anti-gSG6-P1 étaient significativement plus élevés chez les adultes et les adolescents (>14 d'âge) que chez les autres classes d'enfants (0-6 ans et 7-14 ans). Cet « effet âge » est confirmé par l'étude menée à Dakar (Actu-Palu). En effet, à Dakar, le taux d'IgG était significativement augmenté (i) chez les adultes (>17 ans) comparés aux enfants (âgés de 2-10 ans) et (ii) chez les enfants de 6-10 ans comparés aux enfants de 2-5 ans. Les résultats ont montré que l'association entre la réponse IgG anti-gSG6-P1 des adultes et l'agressivité d'*An. gambiae* (données entomologiques) était plus forte que celle observée entre réponse IgG anti-gSG6-P1 des enfants et l'agressivité d'*An. gambiae.* Ceci suggère que les adultes étaient plus piqués par *An. gambiae* que les enfants. De plus, il a été montré que les adultes, du fait leur surface corporelle plus grande et de leur pouvoir attractif des moustiques plus important, sont naturellement plus exposés aux moustiques que les enfants (Carnevale *et al.*, 1978). Un comportement qui les amène à être plus exposés aux piqûres des moustiques que les enfants peut aussi concourir à expliquer cette augmentation de la réponse IgG-anti-gSG6-P1 avec l'âge (Geissbuhler *et al.*, 2007). En effet, la nuit, la plupart des adultes et adolescents des villes d'Afrique sub-saharienne reste longtemps dehors ou dans leur véranda pour regarder la

télévision ou faire toute autre activité au moment où les enfants sont obligés d'aller se coucher. Il s'y ajoute que ces adultes ont souvent plus d'activités après le crépuscule que les enfants. Cet «effet âge» est en accord avec le fait que la réponse immune adaptative (cellulaire et humorale), dans le cadre du paludisme, s'acquiert progressivement avec l'âge (Rogier, 2003; Smith *et al.*, 1999) de façon générale et s'explique par le fait que la probabilité de contact entre les populations et les vecteurs augmente avec l'âge (Drakeley *et al.*, 2005). Il est en concordance avec les résultats d'autres travaux menés en zone rurale sénégalaise chez enfants âgés de 0 à 5 ans. En effet, les auteurs de ces travaux ont rapporté une réponse IgG anti-salive forte chez les enfants âgés de 1 à 3 ans et très faible chez ceux d'âge inférieur ou supérieur (Remoue *et al.*, 2006).

Cependant, la différence de niveau IgG anti-gSG6-P1 entre enfants et adultes de chaque quartier de Dakar n'était pas significative (ou était peu significative). Ceci peut être expliqué par la faiblesse de l'exposition aux antigènes salivaires. A Dakar, une forte utilisation des moustiquaires et autres moyens de lutte anti-vectorielle, pouvant annihiler le gap d'exposition entre ces deux catégories, peut aussi justifier ce manque de significativité de la différence de niveau IgG entre adultes et enfants du même quartier (Bhattarai *et al.*, 2007). D'autant plus que, dans cette étude, chaque enfant était apparié à un adulte du même ménage (un de ses parents), et l'utilisation des moyens de lutte anti-vectorielle était souvent très homogène au sein d'un même ménage.

A Dakar, l'effet de l'âge sur la réponse IgG anti-gSG6-P1 semblait diminuer avec l'exposition. En effet, plus l'exposition était forte, plus les différences de réponse IgG anti-gSG6-P1 entre enfants et adultes et entre enfants de 2-5 ans et de 6-10 ans étaient faibles. Ceci suggère que le degré de contact Homme-*Anopheles* devient similaire entre enfants et adultes des quartiers de forte exposition. Ceci est du à une acquisition précoce et forte et un maintien de la réponse IgG anti-gSG6-P1 sous l'effet des forts taux de piqûres reçues, d'où la similarité des niveaux d'IgG chez les enfants et chez leurs parents adultes dans les quartiers de forte exposition. De plus, les enfants de 6-10 ans et les adultes restent significativement plus forts répondeurs que les enfants de 2-5 ans alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre adultes et enfants de 6-10 ans. Ces résultats suggèrent que, à partir de l'âge de 6 ans, les niveaux d'IgG anti-gSG6-P1 chez les enfants et adultes devenaient similaires malgré le fait que ces derniers soient probablement plus exposés aux piqûres des moustiques anophèles (Carnevale *et al.*, 1978). Cette observation peut être due à une acquisition complète d'une réponse mémoire anti-protéines salivaires entre 6 et 10 ans dans ces 8 quartiers de forte exposition (environs 70 piqûres/homme/nuit). Cependant, les mécanismes et le rôle de cette

réponse mémoire (si elle existe) seraient intéressants à élucider. Cette observation peut être aussi expliquée par un effet protecteur des moustiquaires ou d'autres stratégies de lutte contre le contact avec le vecteur plus marqué chez les adultes, du fait qu'ils sont plus exposés aux piqûres que chez les enfants. De plus, les taux d'utilisation de la moustiquaire étaient de 43,7 et 36,9% chez, respectivement, les adultes et les enfants de 6-10 ans. Ceci suggère que les adultes utilisaient plus la moustiquaire que les enfants de 6-10 ans même si la différence ne paraissait pas significative.

Ces résultats suggèrent donc que la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 peut évaluer au niveau individuel comme populationnel le degré réel de contact entre l'Homme et les moustiques *Anopheles,* même dans les zones de faible densité de vecteurs. Cette observation s'avère particulièrement intéressante puisque dans de telles zones, le risque de paludisme (surtout les formes graves) est élevé chez presque l'ensemble de la population (adultes comme enfants) du fait d'une immunité de prémunition tardive et insuffisante (Rogier, 2003). Ils suggèrent aussi que le peptide gSG6-P1 peut être un biomarqueur d'exposition et de risque de paludisme quel que soit l'âge de l'individu.

X-4- Réponse IgG anti-protéines salivaires comme indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle

Evaluation directe de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIIs)

En Angola, l'utilisation des moustiquaires en février 2006 par les individus était suivie d'une baisse considérable, en avril, de l'intensité moyenne des infections parasitaires qui étaient restées très faibles durant les mois suivants (avril à octobre 2006) comparés à leurs correspondants de 2005. Ceci suggère une efficacité des MIIs sur la réduction des densités moyennes (moy. gémométriques) des infections à *P. falciparum*, un des critères référence d'évaluation de l'efficacité des MIIs. Une utilisation forte et correcte des moustiquaires en bon état (91,7%) était associée à cette baisse comme l'indiquent les enquêtes d'observance. Cette baisse n'était cependant pas significative du fait certainement de la faiblesse de la parasitémie (prévalence et densités parasitaires), donc de l'hypoendémicité de la zone, et de la petitesse de l'échantillon. En effet, il a été montré qu'il était laborieux d'estimer le taux de prévalence parasitaire et de mettre en évidence les infections plasmodiales dans une petite proportion de la population humaine lorsque le niveau de transmission est faible. Ceci rend ces indicateurs de l'évaluation épidémiologique de la transmission et de la lutte anti-

vectorielle biaisés et moins fiables (Beier *et al.*, 1999; Hay *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2009). Toutefois, notre étude conforte l'intérêt que suscite l'utilisation des anticorps anti-protéines salivaires comme outil de l'évaluation épidémiologique de l'efficacité des MIIs (Rogier *et al.*, 2009b). Dans cette étude, la baisse des niveaux d'IgG anti-gSG6-P1 après la mise en place des moustiquaires était très hautement significative, malgré la petitesse de l'échantillon (N=109). Ceci signifie qu'avec un échantillon d'une centaine d'individus seulement, on peut évaluer l'efficacité d'une stratégie de lutte anti-vectorielle en zone de faible endémicité palustre avec la réponse IgG anti-gSG6-P1, grâce à la grande sensibilité de cette méthode. Alors qu'avec les paramètres parasitologiques il faudra un échantillon de l'ordre d'un millier au moins (N>1000). De plus, l'analyse des données entomologiques a montré que les densités d'*An. gambiae* étaient similaires entre 2005 (avant MIIs) et 2006 (après MIIs), si bien que le pic d'exposition d'avril-mai observé n'était pas significativement différent pour ces 2 années. Ceci signifie que la mise en place des moustiquaires n'avait pas d'effet significatif sur les densités d'*An. gambiae*, vecteur majeur du paludisme dans la zone. Une baisse de ces dernières avec l'utilisation des MIIs pourrait entraîner une réduction significative du nombre de piqûres reçues (Mathenge *et al.*, 2001) et du contact Homme-Vecteur. Donc la baisse des niveaux IgG et de la parasitémie observée en avril 2006 n'était pas due à une absence de moustiques mais plutôt à une réduction ou une absence de contact entre les populations et les vecteurs du fait de la barrière physique que confèrent les moustiquaires (Darriet, 1998). L'insecticide d'imprégnation des moustiquaires (Permanet® 3.0) est la deltaméthrine. Comme tout pyréthrinoïde de synthèse, elle entraîne, au contact, une importante mortalité du vecteur ou effet « Knock down » (Darriet *et al.*, 1998). Cet effet « knock down », combiné à l'effet répulsif qu'elle occasionne, devrait normalement se traduire par une réduction de la faune anophèlienne à l'intérieur des maisons et se généraliser dans tout le quartier (Takken, 2002). Donc l'effet non significatif des moustiquaires sur la réduction des densités de moustiques capturés (par pièges lumineux de type CDC) peut être expliqué par 4 facteurs : (i) le fait que les pièges aient été placés dans la cours des maisons et pas à l'intérieur des chambres contenant les moustiquaires (Mboera *et al.*, 1998), (ii) les pièges CDC ne sont pas trop adaptés aux contextes de faible densité de vecteurs (Mbogo *et al.*, 1993), (iii) le faible taux de couverture en MIIs dans la zone (seules quelques familles d'un quartier de la ville de Lobito avaient bénéficié des MIIs pour l'étude) et donc une basence d'effet de masse et (iv) de possibles phénomènes de résistance aux insecticides dans la zone. Les gènes responsables des résistances se sont largement diffusés en Afrique subsaharienne durant ces 2 dernières décennies (Corbel *et al.*, 2010; Ranson *et al.*, 2010). Ceci nous amène à soulever la notion des

différentes formes d'*An. gambiae s.s.* dans la zone d'étude et leur relation respective avec la résistance aux insecticides. En effet, des études antérieures ont confirmé la présence d'*An. gambiae s.s.* avec la prédominance de la forme « M » ou « Mopti » (94%) sur la forme « S » ou « Savannah » (6%) dans la région d'étude (Cuamba *et al.*, 2006). Cette répartition de ces 2 formes moléculaires est tout à fait compréhensible vu le caractère côtier et semi-aride de la région qui peut favoriser la mise en place de gîtes permanents et donc un développement préférentiel de la forme « M ». Par contre, les travaux de J.C. Toto (données non publiées) ont montré la prédominance générale de la forme « S » (82%) par rapport à la forme « M » (18%) chez les moustiques capturés dans les maisons de cette étude. Ceci peut s'expliquer par les contraintes socio-économiques et micro-écologiques favorisant la mise en place de flaques et petites nappes d'eau (du fait de la fréquence des stocks momentanés d'eau de robinet dans les maisons) où la forme « S » vit préférentiellement. Ce résultat appelle donc à une vigilance accrue en terme de lutte anti-vectorielle (P. Carnevale, rapport d'activité Mars 2006) puisque c'est pour la forme « S » que le gène de la résistance aux pyréthrinoides (« kdr ») a été mis en évidence pour la première fois(Chandre *et al.*, 1999), puis retrouvé dans la forme « M » en zone de sympatrie (Weill *et al.*, 2000). Dans la majorité des cas, les mécanismes de résistance aux insecticides font intervenir des changements au niveau du métabolisme ou de la neurotransmission chez l'insecte (Hemingway, 2000; Hemingway and Ranson, 2000), mais aussi des changements étiologiques portant sur le comportement au repos ou au moment de la piqûre (Boreham, 1975; Boreham and Garrett-Jones, 1973). Les résultats entomologiques de cette étude ont rapporté des densités assez importantes d'*An. gambiae* dans les maisons en avril 2006 (2 mois après mise en place des MIIs), malgré la présence, le bon état et la correcte utilisation des MIIs. Bien entendu, ce résultat ne nous permettait pas de se prononcer sur le niveau de résistance des anophèles aux insecticides. Toutefois, l'application de cet outil immunologique, basé sur les réponses Ac anti-protéines salivaires, comme biomarqueur d'exposition spécifique aux piqûres des *An. gambiae* résistants aux insecticides serait une importante voie de recherche. Cependant, des travaux antérieurs (Cuamba *et al.*, 2006) ont suggéré que ce phénomène de résistance serait peu important dans la zone. Toutefois, ces résultats rapportent donc que la réponse IgG anti-protéines salivaires, grâce à une plus grande sensibilité dans la mesure de l'exposition, évalue le contact réel Homme-Vecteur au niveau populationnel, contrairement à la parasitémie (dans une moindre mesure) et aux captures entomologiques. La réponse IgG spécifique aux protéines salivaires d'*An. gambiae* peut donc être un outil complémentaire à ces méthodes classiques dans l'évaluation de l'efficacité de la lutte anti-vectorielle.

De façon surprenante, en juin-juillet (4 mois après la distribution des MIIs) une augmentation significative des niveaux d'IgG anti-gSG6-P1 individuels et médians dans cette population, concomitante à un léger rebond de la parasitémie, a été observée. Ceci peut être mis sous le compte de la baisse d'utilisation et de la qualité des moustiquaires. En effet, 4 mois seulement après leur mise en place, seules 53% des MIIs étaient correctement utilisées (installées) et en bon état (pas endommagées : pas trouées, ni abîmées, ni déchirées ou délabrées). Des observations similaires ont été faites dans de nombreuses autres zones endémiques (Noor *et al.*, 2009). Cette augmentation de la perte de qualité et d'utilisation des MIIs pourrait donc expliquer la hausse des niveaux individuels et médians de réponse IgG notée à partir du mois d'octobre (8 mois après la mise en place des moustiquaires), même si des données de suivi de qualité et d'utilisation des MIIs ne sont pas disponibles pour cette période. D'ailleurs, ces niveaux IgG atteignent des valeurs similaires à celles de 2005 (avant moustiquaires) en décembre 2006 et janvier 2007 (pleine saison pluvieuse). Ce comportement des populations vis-à-vis de cette stratégie de lutte est tout à fait explicable puisque juin-octobre correspond à la saison sèche durant laquelle les basses températures (juin-juillet et août) de l'hiver (australe), défavorables au bon déroulement du cycle gonotrophique et le développement des moustiques, sont enregistrées dans la zone. Ce qui fait que la nuisance culicidienne pendant cette période était très faible pour justifier l'utilisation permanente de moustiquaire de lit. Ceci semble être en adéquation avec des travaux antérieurs stipulant que les populations utilisent réellement les moustiquaires à cause de la nuisance culicidienne et non pas par crainte du paludisme (Carnevale *et al.*, 1988; Carnevale *et al.*, 1991). Cette observation relance ainsi le vrai débat sur les limites éthiques et sociales accompagnant la mise en place des MIIs (acceptabilité des MIIs, déplacement des habitants, habitudes culturelles…) et pose la nécessité d'une forte sensibilisation et d'une bonne surveillance lors des programmes nationaux et internationaux de lutte anti-vectorielle (Doannio *et al.*, 2006).

Dans cette étude, une baisse des niveaux de réponses IgG anti-gSG6-P1 en avril 2006 après la mise en place des MIIs était observée chez presque tous les individus, sauf chez 5 individus. D'ailleurs, le % de répondeurs a fortement chuté en avril (5%) alors qu'en janvier il était de 64%. La majorité de ces répondeurs étant des individus d'âge >14 ans (3/5), ceci confirme l'hypothèse selon laquelle cette classe d'âge présenterait un comportement la mettant plus en contact avec les vecteurs. La réponse IgG anti-gSG6-P1 permet donc d'expliquer le comportement individuel vis-à-vis de l'exposition et de l'utilisation du (ou des) moyen de lutte anti-vectorielle mis en place. Tout ceci souligne l'intérêt opérationnel de ce

type de biomarqueur et son importance dans l'évaluation de l'utilisation à court-terme des MIIs et de la LAV en général.

Ces résultats montrent que l'évaluation de la réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 d'*An. gambiae s. s.* chez des individus exposés aux piqûres du vecteur peut servir d'indicateur de mesure épidémiologique de l'efficacité de l'utilisation des moustiquaires imprégnées en zone de faible endémicité, contexte où les méthodes parasitologiques et entomologiques de référence sont souvent très limitées.

Le gSG6-P1 pour évaluer indirectement l'efficacité de l'utilisation de divers moyens de lutte contre les anophèles en milieu urbain (région de Dakar)

L'analyse des questionnaires épidémiologiques concernant les 45 quartiers de Dakar (Actu-Palu) a montré que plusieurs moyens de lutte contre les vecteurs (moustiquaires, bombes aérosols, serpentins fumigènes…) étaient utilisés, seuls ou en combinaisons, par les populations habitant Dakar et sa région. En tenant compte de certains facteurs connus de variation de la réponse immune humorale, nous avons rapporté une différence d'efficacité de ces outils par la mesure des taux d'IgG anti-gSG6-P1, donc du contact Homme-*Anopheles* ; l'utilisation de la moustiquaire étant de loin la plus efficace. La force de l'impact de son utilisation était associée à celle de l'exposition. Elle était plus marquée chez les enfants de plus de 5 ans en faible et moyenne exposition et de moins de 5 ans en forte exposition.

La grande diversité des moyens de lutte contre les moustiques utilisés par les populations est révélatrice des fortes disparités socio-économiques et parfois culturelles existant entre ménages (ou individus) habitant les grandes villes de l'Afrique subsaharienne comme cela a été montré en Côte d'Ivoire (Doannio *et al.*, 2006) et en Tanzanie (Geissbuhler *et al.*, 2007). Dans notre étude, les taux d'utilisation (mesurés à l'aide de questionnaires) de la moustiquaire (42,9%), des serpentins fumigènes (36,5%) et des bombes aérosols (10,1%) suggèrent que ces moyens de LAV étaient globalement bien appréciés des populations dakaroises. Le taux d'utilisation de la moustiquaire dans cette étude était plus élevé que celui rapporté durant l'hivernage 2008 par le PNLP (16,6% dans la région de Dakar). Ceci est sûrement du à une surestimation, dans notre étude, de ce taux du fait que nos enquêtes ont été menées que chez un enfant et un ou deux adultes (parents de l'enfant) dans chaque concession ou ménage choisi. Cette différence peut être aussi expliquée par le fait que nos enquêtes ont été menées à la fin de l'hivernage, période où il y'a plus de moustiques et nuisance (donc plus de moustiquaires) alors que celles du PNLP avaient couvert toute la saison des pluies. L'utilisation forte des serpentins fumigènes est compréhensible du fait de leurs prix très

abordables (Doannio *et al.*, 2006) et de leur grande disponibilité en milieu urbain (on les trouve même dans les plus petites boutiques des quartiers). Les bombes aérosols étaient moins utilisées puisqu'étant plus chers et sur le marché que depuis 2 décennies. Contrairement à l'étude ivoirienne (Doannio *et al.*, 2006), l'utilisation des moustiquaires était plus importante que celle des bombes aérosols et des serpentins fumigènes, suggérant que les moustiquaires constituaient le 1er choix de la population pour se prévenir des piqûres des moustiques. Ceci est surtout du à une très bonne promotion de l'utilisation de la moustiquaire par les autorités sanitaires (PNLP surtout) via les médias (télévisions surtout) et les campagnes de distribution en masse et dans les centres de santé durant l'hivernage. Cette différence de résultats entre les 2 études peut être expliquée par une différence d'endémicité et de considérations socio-économiques comme cela a été décrit en Tanzanie (Geissbuhler *et al.*, 2007). De plus, une interdépendance dans l'utilisation de ces moyens de lutte a été notée. L'utilisation des autres moyens de lutte semblait ainsi dépendre de celle des moustiquaires. En effet, 75,6% des populations n'utilisant aucun autre moyen de lutte avaient adopté la moustiquaire. En revanche, seuls 20,1% des populations utilisant d'autres moyens de lutte (moyens autres que les moustiquaires) avaient adopté la moustiquaire. Ces travaux confirment ceux de l'étude tanzanienne qui ont montré que l'utilisation des rideaux imprégnées (pour fenêtres et portes des chambres) était négativement corrélée à celle de la moustiquaire (imprégnée ou pas) (Geissbuhler *et al.*, 2007). Ceci veut dire que les populations de cette région utilisent les autres moyens de lutte en remplacement aux moustiquaires qui leurs sont inaccessibles pour diverses raisons. Parmi les raisons avancer pour justifier la non utilisation de la moustiquaires, l'absence de moustiques (46,4%) et la chaleur (16,3%) étaient les principales (PNLP-Sénégal, 2009).

L'analyse multivariée, en tenant compte notamment de « l'effet quartier » a montré que l'utilisation de la moustiquaire était le principal facteur associé à la baisse des taux d'IgG spécifiques au peptide gSG6-P1, donc à la réduction du contact Homme-*Anopheles* quels que soient l'individu (enfant ou adulte), le quartier et le groupe d'exposition. Cependant, cette protection pourrait ne pas être suffisante du fait d'un probable comportement exophage chez *An. arabiensis* (Geissbuhler *et al.*, 2007) qui assure majoritairement la transmission dans la région (Pages *et al.*, 2008). Sous l'effet des nombreuses stratégies de lutte anti-vectorielle utilisées par les populations, ce vecteur peut adopter un comportement exophage et une modification de son pic d'activité comme cela a été montré à Dar ES Salam (Geissbuhler *et al.*, 2007). En effet, dans cette capitale urbaine, il a été montré que l'activité maximale d'*An. arienbiensis* était observée vers 22h et non pas dans la 2ème moitié de la nuit comme

habituellement, ce qui faisait que les populations étaient souvent plus piquées en dehors des maisons ou des chambres où sont installées les moustiquaires (Geissbuhler *et al.*, 2007). Dans certains quartiers populeux (comme ceux de Pikine) de la région de Dakar, les populations ont tendance à rester tard (au-delà de minuit au minimum) ou à passer la nuit à la « belle étoile » du fait de la chaleur et du manque de ventilation ou aération dans leurs maisons. *An. melas* a été aussi capturé en faibles densités dans quartier les plus côtiers mais apparaissait nettement moins agressif qu'*An. arienbiensis.* De plus, *An. melas* n'était pas infecté par des sporozoïtes de *Plasmodium* dans aucun des quartiers étudiés (Machault *et al.*, 2009).

Cette réduction de la réponse IgG anti-gSG6-P1, du fait de l'effet protecteur contre les piqûres d'*Anopheles* que confère l'utilisation de la moustiquaire, augmente avec l'exposition. En effet, les populations utilisant la moustiquaire avaient un taux d'IgG spécifiques significativement plus faibles que celles qui ne l'utilisaient pas dans les groupes de faible exposition (*P=0,003*), de moyenne exposition (*P=0,0002*) et de forte exposition (*P<0,0001*). Ceci est du à une utilisation de la moustiquaire plus forte dans les quartiers de forte exposition comme le montre les résultats. Le taux d'utilisation de la moustiquaire était de 37,2% dans le groupe de faible exposition, 43,0% dans le groupe de moyenne exposition et de 51,6% dans le groupe de forte exposition. Cette augmentation du taux d'utilisation et de l'effet de la moustiquaire sur la baisse des niveaux IgG anti-gSG6-P1 avec l'exposition était observée aussi bien chez les enfants que chez les adultes. Ceci suggère que, même en milieu urbain, les populations (enfants comme adultes) utilisent la moustiquaire plus contre les nuisances causées par les moustiques que pour lutter contre le paludisme, confirmant ainsi de nombreuses observations faites en milieux rural et urbain (Carnevale *et al.*, 1978; Carnevale and Mouchet, 1987; Doannio *et al.*, 2006). Chez les enfants, bien qu'elle soit plus utilisée avec le degré d'exposition, la moustiquaire n'a entraîné une réduction de la réponse IgG anti-gSG6-P1 que chez les 6-10 ans dans les groupe de faible (*P=0,03*) et de moyenne exposition (*P=0,02*) alors que dans le groupe de forte exposition cette réduction significative a été observé uniquement pour les enfants de 2-5 ans (*P=0,002*). Ceci suggère que, dans les groupes de faible et moyenne exposition, les enfants qui n'utilisaient pas la moustiquaire étaient très peu ou pas piqués du fait, probablement, de la très faible densité ou de la quasi absence des anophèles. En revanche, dans le groupe de forte exposition, le degré de piqûres était suffisamment fort pour que les enfants qui ne dormaient pas sous moustiquaire soient en contact avec les anophèles. Une réduction significative du taux d'IgG spécifique avec l'utilisation de la moustiquaire n'a pas été observéepour les enfants de 6-10 du groupe de forte exposition. Ceci peut être du par leur faible taux d'utilisation de la moustiquaire (44,1%)

comparés aux enfants de 2-5 ans (56,8%). Après la moustiquaire, seule l'utilisation des bombes aérosols (seules ou combinées) était secondairement associée à une baisse significative des niveaux IgG spécifiques dans la population globale (chez les enfants comme chez les adultes). Les aérosols qui sont constitués, pour la plupart, de pyréthrinoïdes de synthèse (res-méthrine, esbiothrine, etc.) ont une forte et très rapide action « knock-down » (KD). Ils peuvent donc réduire fortement les densités de la « frange » endophile et endophage des populations anophéliennes et le contact Homme-*Anopheles*. Mais leur efficacité sur la réduction du contact Homme-*Anopheles* est limitée par la non rémanence des produits utilisés (Pages *et al.*, 2008). Cependant, leur utilisation et leur efficacité sont très limitées par des facteurs socio-économiques telles que la chéreté de leur prix et leur appréhension par les populations (Pages *et al.*, 2008). L'inefficacité des serpentins fumigènes sur la réponse IgG anti-gSG6-P1, donc la réduction du contact Homme-*Anopheles*, est toutefois surprenant vu leur fort taux d'utilisation par les populations (36,5%). Elle peut être expliquée par le fort effet dissuasif du fait de la fumée qu'ils dégagent, ce qui a plutôt tendance à repousser (au lieu de les tuer) les anophèles vers l'extérieur où ils pourront piquer. L'inefficacité de l'utilisation de l'encens était cependant attendue puisqu'aucune action insecticide ou insectifuge qui lui est propre n'a jamais été démontrée scientifiquement.

Cependant, chez les populations utilisant la moustiquaire et les bombes aérosols, le taux d'IgG anti-gSG6-P1 était significativement plus faible dans le groupe de faible exposition comparé aux groupes de forte et moyenne exposition. Ceci montre que le degré de contact Homme-*Anopheles* était resté plus fort dans ces 2 derniers groupes. Cette observation confirme ainsi la partialité de la protection conférée par l'utilisation de la moustiquaire par les populations. Cette partialité est tout à fait compréhensible vu la faiblesse des taux de couverture de la moustiquaire dans ces quartiers. En effet, il fallait des taux de couverture de 70-80% au moins dans chaque quartier ou groupe pour espérer que la moustiquaire puisse conférer une réduction significative de la transmission, et donc du contact Homme-*Anopheles*, en dessous d'un seuil épidémiologique acceptable (Hawley *et al.*, 2003; Le Menach *et al.*, 2007; Maxwell *et al.*, 1999). Le fort comportement exophage *d'An. arabiensis*, vecteur principal des *Plasmodium* dans cette région, associé aux veillées nocturnes des populations, peut expliquer cette partialité de la protection malgré l'utilisation combinée de la moustiquaire et des bombes aérosols (ou serpentins fumigènes). Ceci veut dire que des outils supplémentaires sont nécessaires pour parvenir à contrôler les vecteurs et le risque de paludisme dans à Dakar et sa banlieue. Parmi ces options additionnelles, on peut imaginer une lutte anti-larvaire (Fillinger and Lindsay, 2006; Killeen *et al.*, 2002) pour contenir la

transmission assurée par les vecteurs exophages et un contrôle environnemental (Keiser *et al.*, 2005) qui peuvent faire partis des programmes de lutte intégrée.

La réponse IgG spécifique au peptide gSG6-P1 semble être pertinente pour évaluer l'efficacité de l'utilisation de différentes stratégies de lutte contre *An. gambiae s. l.* sur la réduction du contact avec les populations humaines (enfants comme adultes) en milieu urbain, malgré la faiblesse de l'exposition et sa forte hétérogénéité. Le gSG6-P1 peut donc être un outil complémentaire aux méthodes entomologiques et parasitologiques de référence qui sont souvent très limitées en zone de faible exposition et transmission, surtout en contexte urbain où une diversité de moyens de lutte (ou de protection) sont utilisés. Il serait donc intéressant d'intégrer ce peptide biomarqueur dans les études socio-anthropologiques de lutte anti-vectorielle et de lutte antipaludique en général.

X-5- Labilité des IgG spécifiques au peptide gSG6-P1 : une propriété immunologique d'un biomarqueur ?

La labilité des IgG spécifiques, du fait de leur courte période de vie, observée dans cette étude constitue une intéressante particularité de ce type de biomarqueur « salivaire » et confirme de précédents travaux menés dans notre groupe de recherche (Orlandi-Pradines *et al.*, 2007; Poinsignon *et al.*, 2009; Poinsignon *et al.*, 2008a; Remoue *et al.*, 2006). Ceci veut dire que les IgG anti-protéines salivaires ne s'accumulent pas avec le temps et disparaissent rapidement (6 semaines par exemple dans l'étude angolaise) quand l'exposition, donc le contact Homme-Vecteur, est nulle. Cette propriété permet donc de ne diagnostiquer que les piqûres récentes et non pas celles reçues plusieurs mois. Ceci permet d'avoir une plus grande précision dans l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité de la lutte, donc du risque de transmission. Des observations similaires ont été faites sur les réponses IgG anti-parasites (plasmodiums) dans certains cas (Kinyanjui *et al.*, 2007) surtout chez les jeunes enfants (Akpogheneta *et al.*, 2008). Cependant, d'autres travaux ont rapporté une forte persistance de cette réponse protectrice jusqu'à 6 mois après l'infection parasitaire (Drakeley *et al.*, 2005; Taylor *et al.*, 1996). Dans l'étude de l'Angola, la proportion de répondeurs et le taux médian de réponse IgG anti-gSG6-P1 dans la population ont significativement chuté entre janvier (un mois avant MIIs) et avril 2006 (2 mois après MIIs). Il en est de même pour les niveaux de réponses IgG individuelles qui ont fortement baissé de janvier à avril si bien que seuls 5 individus étaient répondeurs en avril (5%) alors qu'en janvier ils étaient 64% de répondeurs. Ainsi, une forte chute voire une disparution d'IgG spécifiques peut être observée 2 mois après

l'interruption du contact Homme-Vecteur par l'utilisation de la moustiquaire (ou autres moyens de LAV). Ceci veut dire que les IgG anti-gSG6-P1 acquis ne sont pas stériles et disparaissent très vite à l'absence continue d'une exposition aux piqûres. Il serait toutefois nécessaire d'étudier les mécanismes de la cinétique (apparition et disparution) de cette réponse Ac anti-protéines salivaires d'*Anopheles* en fonction du degré réel d'exposition aux piqûres. Par exemple, une forte réponse mémoire anti-salive de phlébotomes a été observée 6 mois après une première exposition chez des individus d'une région endémique de l'Inde (Clements *et al.*, 2010). Il a été aussi montré, dans un modèle murin, qu'une réponse mémoire anti-*Plasmodium chabaudi* peut persister et résister au traitement antipaludique 8 mois après infection (Ndungu *et al.*, 2010). Chez des individus thaïlandais, une réponse mémoire stable, associée à la persistance d'Ac-IgG (et isotypes) spécifiques à des antigènes de *P. falciparum* et de *P. vivax,* a été rapportée (Wipasa *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les travaux présentés dans cette thèse contribuent au développement de nouveaux biomarqueurs immunologiques évaluant l'exposition de l'Homme aux piqûres des anophèles vecteurs responsables de la transmission du paludisme. Un objectif principal de cette thèse était focalisé sur l'application d'un biomarqueur spécifique pour évaluer l'efficacité des différentes stratégies de lutte dirigées contre ces anophèles vecteurs. Les moyens actuels évaluant l'exposition aux vecteurs, le risque de transmission du paludisme et l'impact des méthodes de lutte sont essentiellement des méthodes entomologiques (densité ou agressivité des moustiques) et parasitologiques (indices parasitaires). Compte tenues de plusieurs limites de sensibilité endiguant leur efficacité, ces paramètres peuvent être difficiles à estimer, notamment en zones de faible exposition et transmission et chez les très jeunes enfants et nouveau-nés. Donc, pour une maîtrise holistique du paludisme, le développement de nouveaux outils complémentaires, permettant d'évaluer le risque d'exposition des populations humaines et des individus aux piqûres des anophèles vecteurs et l'efficacité des stratégies de contrôle, s'avère indispensable.

Pour répondre à cet enjeu, nous avons, par des études immuno-épidemiologiques menées dans 4 zones d'endémicités palustres différentes (en Angola : milieu semi-urbain d'hypo-endémicité ; au Sénégal : milieu urbain d'hypoendémicité et milieu rural de mosoendémicité ; au Bénin : milieu rural de forte endémicité palustre), étudié la relation immune Homme-Vecteur en exploitant les propriétés immunogéniques de certaines protéines salivaires des anophèles. Antérieurement, plusieurs travaux ont montré que l'analyse des réponses anticorps contre des antigènes de la salive d'arthropodes, sous forme native, recombinante ou synthétique pourrait être utilisée pour évaluer le niveau de l'exposition de l'homme aux piqûres des vecteurs. Ces travaux ont porté notamment sur les systèmes hôte (homme ou animal)-phlébotome et hôte-tique, rarement sur le système Homme-*Anopheles* bien que son importance fût soulignée depuis plus de 6 décennies. Nous avons ainsi imaginé que les réponses Ac spécifiques aux antigènes salivaires d'*Anopheles* pourraient, une fois validées comme biomarqueur d'exposition, servir d'outil permettant d'évaluer les stratégies visant à réduire ou empêcher le contre entre l'Homme et ces vecteurs du paludisme. Nous avons par la suite focalisé nos recherches sur cette thématique de biomarqueur/indicateur d'efficacité de la lutte anti-vectorielle.

Dans un premier temps, nous avons validé le concept que l'évaluation de la réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae* représentait (i) un biomarqueur d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae,* donc au risque de transmission du paludisme, (ii) et un indicateur de l'efficacité des moustiquaires imprégnées d'insecticide (MIIs) dans le cadre

d'une LAV (étude Angola). La réponse IgG spécifique aux extraits salivaires totaux d'*An. gambiae*, bien corrélée aux paramètres entomologiques et parasitologiques de référence, pouvait permettre de discriminer des individus et populations exposés ou non aux piqûres et d'évaluer l'efficacité de l'utilisation des MIIs dans une cohorte angolaise spécifique (enfants et adultes). De plus, le taux d'Ac spécifique à la salive d'*An. gambiae s. s.* semble permettre une meilleure évaluation de l'efficacité des moustiquaires imprégnées dans cette zone d'hypo-endémicité palustre que les méthodes entomologiques et parasitologiques classiques. En effet, la mise en place des MIIs était suivie, 2 mois après, d'une forte baisse des taux d'IgG anti-salive chez presque tous les individus et d'une chute « faible » de la parasitémie, alors que les densités moyennes d'*An. gambiae s. s.* avaient augmenté. Ainsi, le concept « réponse anticorps anti-salive » a été validé comme indicateur de l'efficacité des MIIs dans le cadre de la LAV.

Dans l'objectif d'identifier un biomarqueur d'exposition spécifique aux anophèles vecteurs et de l'efficacité réelle de l'utilisation de stratégies de lutte contre les anophèles vecteurs à grande échelle, le peptide gSG6-P1 de la protéine salivaire gSG6 a été récemment identifié (Poinsignon *et al.,* 2008). Ce peptide qui a été ensuite validé comme biomarqueur d'exposition (Poinsignon *et al.,* 2009) dans notre équipe, semble évaluer de façon plus nette et précise l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae* et l'efficacité réelle du des MIIs sur la réduction du contact Homme-*Anopheles* que la salive totale. Cette dernière (la salive totale), sous l'effet de potentiels phénomènes de cross-réactivité avec d'autres vecteurs, a tendance à sousestimer ou à surestimer le degré d'exposition aux piqûres d'*An. gambiae.* Par ailleurs, le peptide gSG6-P1 semble être un biomarqueur optimal de l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité réelle des MIIs, même si elles ne sont utilisées que durant une courte période (efficacité à court terme). Ce peptide est aussi pertinent pour l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité réelle de l'utilisation des MIIs dans les contextes de faibles et très faibles densités anopphéliennes où les méthodes entomologiques et parasitologiques présentent des limites de sensibilité. Comme nous l'avons montré en Angola, le gSG6-P1 peut aussi servir d'outil permettant de suivre l'efficacité des MIIs et de détecter les périodes où les MIIs ne sont plus efficaces (= marqueur à long terme). Il peut donc servir d'un outil de surveillance de l'exposition et de la lutte anti-vectorielle. Par exemple, il peut permettre de mieux évaluer la nécessité de mettre en place une nouvelle campagne de sensibilisation des populations ou d'une nouvelle stratégie.

Cette étude constitue un premier pas dans la validation de ce peptide comme outil d'évaluation de l'efficacité des stratégies de lutte anti-vectorielle. Un tel outil serait donc plus

adapté aux études d'efficacité de phase 3 où les indices parasitaires de référence évalués chez l'homme présentent des limites en termes de sensibilité et de logistique. Pour répondre à cet objectif, notre projet a été intégré dans une large étude (projet REFS) au Sud Bénin, zone d'hyper-endémicité palustre et de forte fréquence des gènes de résistance aux insecticides courants. Ce projet vise à évaluer l'efficacité de différentes interventions contre les vecteurs du paludisme utilisées seules ou combinées. Il a concerné 28 villages répartis dans 4 bras d'intervention (7 villages/bras) : (1) un bras témoin ou PNLP (moustiquaires imprégnées de longue durée utilisées que par les enfants de moins de 5 ans), (2) un bras MILDs (MILDs chez toute la population, enfants comme adultes), (3) un bras MILDs + bâches imprégnées de Bendiocarb (organophosphoré) et (4) un bras IRS (aspersions intradomiciliaires de Bendiocarb). Dans chaque village un suivi entomologique, parasito-clinique et immuno-épidémiologique (réponse Ac anti-gSG6-P1) chez 60 enfants de moins de 5 ans a été mené toutes les 6 semaines durant 2 ans (une première année de pré-intervention et une deuxième de suivi post-intervention). Les dosages immunologiques d'anticorps anti-gSG6-P1 sont en cours et constitueront la suite immédiate des travaux de cette thèse, au cours d'un post-doctorat financé par la Fondation Infectiopôle Sud (Marseille, France).

Comme second objectif de cette thèse, nous avons appliqué l'utilisation de ce peptide biomarqueur dans l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité des différentes stratégies de lutte anti-vectorielle utilisées par les populations vivant dans 45 quartiers de la région de Dakar, zone urbaine (étude Actu-Palu). Ainsi, une hétérogénéité de la réponse IgG anti-gSG6-P1 entre individus, quartiers et groupes de quartiers, semble indiquer que le taux d'IgG spécifique à gSG6-P1 a permis de discriminer les faibles des fortes expositions et d'évaluer l'hétérogénéité de l'exposition, aux niveaux individuel et populationnel, dans la région de Dakar. Ce marqueur peut donc apprécier l'hétérogénéité du risque de transmission du paludisme entre individus et quartiers des zones urbaines où le fort taux d'accroissement de la population urbaine favorise le développement du paludisme dans des environnements sanitaires inégalement développés. Cette forme de paludisme « urbain » est un réel enjeu de santé publique qui ne peut que s'accroître avec le développement anarchique des mégalopôles africaines. Le développement d'un tel biomarqueur « urbain » semble être ainsi une voie importante pour le contrôle du paludisme chez ces populations. Un tel biomarqueur serait aussi particulièrement intéressant dans les études socio-anthropologiques intégrant différentes stratégies de lutte antivectorielle.

Ce biomarqueur pourrait représenter un outil épidémiologique utile pour la meilleure compréhension des dynamiques temporelles et spatiales de la transmission dans les situations

de faible exposition anophélienne (zone urbaine, altitude…). Dans ces contextes, où les formes graves du paludisme sévissent souvent chez le jeune enfant comme chez l'adulte, l'utilisation de nombreuses méthodes de lutte contre les moustiques sont fréquentes, mais leur efficacité est difficilement estimable par les paramètres entomologiques et parasitologiques classiques. Par ailleurs, l'analyse des réponses IgG spécifiques à gSG6-P1 a montré que, dans Dakar et sa région, parmi les diverses méthodes utilisées différemment en fonction de l'exposition, seules la moustiquaire (surtout, imprégnée ou non) et les bombes aérosols permettaient de réduire significativement le contact Homme-*Anopheles*, et donc le risque de transmission du paludisme chez l'enfant comme chez l'adulte. Le gSG6-P1 permet donc d'appréhender l'efficacité des différentes stratégies de lutte contre les anophèles utilisées par les populations des villes. Dans le cadre de la lutte contre le paludisme, le peptide gSG6-P1 permettrait ainsi d'identifier les populations urbaines les plus à risque de transmission des plasmodiums et d'orienter les campagnes de distribution en masse de moustiquaires imprégnées ou autres moyens de prévention aux foyers présentant une probabilité plus forte de contacts entre les populations humaines et les moustiques *Anopheles*. L'obtention d'un marqueur immuno-épidémiologique basée sur une approche quantitative et qualitative de la réponse Ac anti-protéines salivaires permettrait alors l'évaluation efficace des risques de morbidité/mortalité du paludisme et serait un critère d'efficacité des MIIs lors des programmes de lutte contre les vecteurs du paludisme.

Pour une meilleure visibilité de l'hétérogénéité du risque de paludisme dans Dakar et sa région, une cartographie (SIG) de la zone, intégrera les données immuno-épidémiologiques (réponse Ac anti-gSG6-P1), parasitologiques (Equipe IRD-UMR216 de J-Y Lehesran), entomologiques (équipe de l'IMTSS de F. Pagès, Marseille) et socio-démographiques (équipe IRD-UMR151 de R. Lalou) recueillies dans chaque quartier ou ménage.

Par ailleurs, les travaux de cette thèse ont suggéré que ces mesures préventives de lutte doivent être menées différemment selon l'âge des populations et le degré d'exposition. A Dakar, toutes les populations semblent être confrontées à un fort risque de paludisme, notamment dans les quartiers de forte exposition « urbaine ». Dans les zones de faible ou moyenne exposition de Dakar, les enfants âgés de 6-10 ans et les adultes étaient plus à risque. Une stratégie préventive devrait alors couvrir toute la population dans les districts de forte exposition et prioritairement les enfants de 6-10 ans et les adultes dans les autres zones d'exposition.

L'utilisation d'un marqueur immuno-épidémiologique à un niveau individuel doit néanmoins être considéré avec précaution. En effet, des cofacteurs non contrôlables tels que le

statut nutritionnel, les co-infections, le patrimoine génétique, etc. peuvent influencer le système immunitaire des personnes exposées.

Dans un troisième temps, la grande sensibilité de la réponse Ac contre le peptide gSG6-P1 et sa spécificité aux moustiques de genre *Anopheles* nous ont permis d'évaluer l'exposition aux piqûres et le risque de transmission des plasmodiums par (i) *An. gambiae* et *An. funestus*, à la fois, chez de très jeunes enfants (inférieur ou égal à 1 an) d'un milieu rural hyper-endémique du Bénin et (ii) d'*An. funestus* seul chez des enfants de 0-9 ans d'un village rural méso-endémique du Sénégal. Le peptide gSG6-P1, permet ainsi d'évaluer l'exposition aux piqûres d'*An. funestus* qui, avec le complexe *An. gambiae*, assure principalement la transmission du paludisme en Afrique subsaharienne.

Le gSG6-P1 constitue de ce fait un outil optimal de l'évaluation réelle de l'exposition aux piqûres de différentes espèces de vecteurs *Anopheles* quel que soit le contexte épidémiologique. La mise en place d'un biomarqueur d'exposition commun à ces 2 vecteurs majeurs du paludisme en Afrique tropicale et intertropicale s'avère particulièrement intéressante et utile puisque la plupart des populations africaines se trouve exposer à la fois ou successivement aux piqûres de ces 2 espèces (ou complexe d'espèces) d'*Anopheles*. Par ailleurs, il serait aussi intéressant de tester ce peptide dans l'évaluation de l'exposition à d'autres vecteurs du paludisme d'Afrique tropicale (*An. melas*, *An. nili* et *An. moucheti*), d'Amérique du Sud (*An. darlingi*) et d'Asie du Sud-Est (*An. stephensi*, *An. dirus*…) afin de mettre en place un biomarqueur commun à tous les vecteurs du paludisme. D'autant plus que dans une région, plusieurs vecteurs (principaux et secondaires) peuvent vivre en sympatrie.

Les enfants, en particulier les plus jeunes (<5 ans), sont les principales victimes de la mortalité palustre en zone d'hyper-endémicité. La disponibilité d'un biomarqueur d'exposition à la piqûre d'*An. gambiae* leurs serait particulièrement destinée pour évaluer les risques de transmission du paludisme. Nous avons montré que la réponse IgG anti-gSG6-P1 pouvait servir de biomarqueur pertinent aussi bien pour les enfants que pour les adultes, mais avec plus de fiabilité chez les enfants de 0-6 ans.

L'acquisition de la réponse IgG (réponse mature) semble se faire progressivement avec l'âge. Chez les enfants de la cohorte de Tori Bossito (sud du Bénin), cette acquisition semble débuter entre 3 et 6 mois, pour être effective entre 9 et 12 mois après la naissance. Le profil d'acquisition de la réponse IgG suggère la présence d'anticorps maternels chez les jeunes enfants. Ces Ac maternels seraient transmis de la mère à l'enfant au cours de la vie intra-utérine et au cours des 6 premiers mois de l'allaitement. De ce fait, l'utilisation des IgG anti-gSG6-P1 comme biomarqueur d'exposition chez les enfants âgés de moins de 6 mois ne

s'avère pas pertinente. Pour plus de précision sur la durée de la transmission mère-enfant d'IgG et le début de l'acquisition des IgG à l'enfance sous l'effet des piqûres d'*Anopheles*, il serait nécessaire et intéressant d'étudier la réponse IgM (réponse précoce qui précède les IgG) spécifique au gSG6-P1 que les enfants sont susceptibles de développer sous l'effet les premières expositions aux piqûres d'*Anopheles*. Les dosages des anticorps IgM spécifiques au peptide gSG6-P1 sont en cours dans notre laboratoire et les résultats complets seront disponibles et analysés dans les prochains mois. Cette étude constitue, néanmoins, un premier pas dans la compréhension de l'acquisition des réponses Ac spécifiques à gSG6-P1 chez des enfants résidant en zone endémique et permet de valider l'utilisation de ce biomarqueur chez les très jeunes enfants. Afin de mieux comprendre les mécanismes de cette acquisition, les données IgG (et IgM) anti-gSG6-P1 seront comparées aux données environnementales et entomologiques recueillies dans les différents villages où habitaient les enfants de cette cohorte. D'autant plus qu'une étude préliminaire menée dans notre équipe (thèse Dr. A. Poinsignon) avait montré que cette acquisition d'IgG anti-gSG6-P1 semblait débuter à partir de 7 mois et être effective entre 19 et 25 mois après la naissance en zone de mésoendémicité palustre.

Nous avons rapporté, quelle que soit l'intensité de l'exposition ou de la transmission, une forte labilité des IgG anti-gSG6-P1 spécifiques. Cette propriété permet donc de ne diagnostiquer que les nouvelles piqûres et d'avoir une plus grande précision dans l'évaluation de l'exposition et de l'efficacité de la lutte. Cependant, il serait toutefois nécessaire d'étudier les mécanismes de la cinétique de cette réponse Ac anti-protéines salivaires.

Par ailleurs, du fait de la forte labilité de la réponse Ac spéficique, ce peptide serait un outil optimal de l'évaluation des variations saisonnières de l'exposition et du risque épidémiologique de paludisme dans les zones où l'exposition n'est pas très forte. En effet, les techniques parasitologiques peuvent présenter des limites en termes de sensibilité et le suivi est contraignant avec un suivi parasitologique tous les 3 jours. De plus, cette méthodologie de référence présente des limites lors de fluctuations saisonnières, caractéristiques de l'épidémiologie du paludisme d'une grande partie de l'Afrique de l'Ouest. De ce fait, le projet EpiVect qui a accueilli cette thèse sera intégré dans une étude visant à évaluer les variations saisonnières de l'exposition dans des villages du Mali (collaboration avec le MRTC)

L'ensemble des conclusions faites dans cette thèse, ainsi que son apport dans le développement de biomarqueurs à *Anopheles* et les perspectives qui en découlent, sont résumé dans le tableau ci-dessous.

Tableau 14: Biomarqueurs : les apports de la thèse

Outils	Bio-marqueurs	Cohorte et contexte épidémiologique	Auteurs
Travaux antérieurs			
Extraits salivaires totaux d'*Anopheles*	Mesure de l'exposition aux piqûres infectantes et non infectantes d'*An. gambiae,* d'*An. dirus* et d'*An. darlingi*	Enfants de 0-5 ans en zone rurale sénégalaise(mésoendémicité palustre)	Remoue *et al.,* 2006
		Adultes de zones d'endémie thaïlandaises	Waitayakul *et al.,* 2006
		Adultes volontaires brésiliens (zone de transmission faible)	Andrade *et al.,* 2009
		Militaires français en mission en Côte d'Ivoire et au Gabon	Orlandi-Pradines *et al.,* 2009
	Prédictif de morbidité et de la symptomatologie du paludisme	Enfants de 0-5 ans en zone rurale sénégalaise(mésoendémicité palustre)	Remoue *et al.,* 2006
		Adultes volontaires brésiliens (zone de transmission faible)	Andrade *et al.,* 2009
Peptide gSG6-P1	Identification et validation comme marqueur d'exposition à *An. gambiae s.l.*	Enfants de 0-5 ans moyennement exposés (Niakhar, Sénégal)	Poinsignon *et al.,* 2008
		Enfants de 0-5 ans faiblement exposés (Niakhar, Sénégal)	Poinsignon *et al.,* 2009
Travaux de thèse			
Extraits salivaires totaux d'*An. gambiae s. s.*	Mesure de l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae s. s.* et indicateur d'efficacité des MIls	Enfants et adultes à Lobito (Angola): zone côtière de faible transmission palustre	Drame *et al.,* 2010
	Mesure de l'exposition aux piqûres d'*An. gambiae s. s.* et indicateur d'efficacité des MIls		Drame *et al.,* soumis
	Mesure hétérogénéité de l'exposition aux faibles densités d'*An. gambiae s. l.* en zone urbaine	Enfants et adultes de la région de Dakar (zone urbaine)	Drame *et al.,* soumis
	Evaluation de l'efficacité de différentes stratégies de lutte anti-vectorielle en zone urbaine		Drame *et al.,* en rédaction
	Mesure de l'exposition aux piqûres d'*An. funestus*	Enfants 0-9 ans du village Gankette Balla (forte exposition à *An. funestus*)	Poinsignon *et al.,* 2010
	Mesure de l'exposition aux piqûres d'*An. funestus* et d'*An. gambiae,* acquisition et transfert d'anticorps spécifiques mère-enfant	Enfants 0-12 mois de la commune rurale de Tori Bossito (Sud Bénin): zone d'hyperendémicité et de forte résistance des vecteurs aux insecticides	Drame *et al.,* en préparation

Tableau 14 : Biomarqueurs : les apports de la thèse (suite)

Travaux futurs			
Peptide gSG6-P1	Efficacité comparée de différentes stratégies de LAV	Enfants 0-5 ans, 28 villages du Sud Bénin (projet REFS)	En cours
	Exposition saison sèche	Enfants et adultes en zone rurale (étude Mali, MRTC)	En cours
		Enfants 0-9 ans de différents villages (étude Pal-Fleuve)	
	Exposition aux piqûres d'*Anopheles* chez les voyageurs en zone d'endémie	Travailleurs marins européens en escale en Afrique (projet CGG-Veritas	En cours
protéine/peptide gVAG	Validation comme biomarqueur d'exposition aux piqûres infectantes d'*Anopheles*	Projet REFS (Bénin) + projet Niakhar (Sénégal)	Prévu en 2011-2012

Les travaux de cette thèse ont permis par des approches pluridisciplinaires d'identifier et de valider des marqueurs immunologiques (extraits salivaires totaux et gSG6-P1 d'*An. gambiae*) évaluant (i) l'exposition des populations humaines aux piqûres des anophèles et (ii) l'efficacité de la lutte anti-vectorielle en zones urbaine et semi-urbaine d'hypo-endémicité et rurale de méso-endémicité. Des études auxquelles le projet EpiVect est associé sont actuellement développées et permettront de valider le peptide gSG6–P1 dans d'autres contextes épidémiologiques (voyageurs, militaires, autres stratégies de la LAV).

Par ailleurs, le développement de biomarqueur d'exposition spécifique de piqûres infectantes pourrait également représenter une voie intéressante de recherche. Ce type de marqueur pourrait permettre de relier la morbidité/mortalité avec l'exposition aux vecteurs infectés et ainsi obtenir un biomarqueur, non seulement de risque de transmission, mais aussi prédictif de morbidité. L'expression de certaines protéines salivaires est altérée lorsque l'insecte est infesté par un pathogène. Par exemple, l'expression de la protéine gVAG est augmentée chez un anophèle infecté. Cette protéine pourrait représenter ainsi un candidat biomarqueur d'exposition à la piqûre infectante comme le projet EpiVect pourrait le démontrer dans le futur. Ce candidat serait particulièrement intéressant comme indicateur d'efficacité de la LAV dans les zones d'hyper et d'holo-endémicité palustre. Dans ces zones, le peptide gSG6-P1 pourrait être limité, suite à une saturation du système immunitaire humorale du fait de quantités excessives de piqûres (infectantes et non infectantes) reçues par les populations. Il peut aussi être utile dans les cas où les stratégies de la LAV entraîneraient

une diminution modérée des taux de piqûres (infectantes et non infectantes). Dans ces situations, une baisse plus marquée de piqûres infectantes peut être observée. Il n'est pas évident que le peptide gSG6-P1 permette de mettre en évidence cette baisse, car tenant compte aussi des piqûres non infectantes, contrairement à la gVAG.

Les travaux de cette thèse contribuent à une meilleure connaissance des relations immunes Homme-Vecteur au cours du paludisme, pathologie majeure tropicale et intertropicale. Ce type d'approche peut être appliquée à d'autres maladies à transmission vectorielle émergente ou réemergente (arbovirose) tant dans les pays du Sud que du Nord. Le développement de ce type de biomarqueur et l'approche de recherche élaborée dans cette thèse semblemt présenter un intérêt tout particulier pour évaluer l'exposition à *Aedes* et ainsi mesurer les risques de transmission d'arboviroses émergentes (Dengue, Chikungunya) et l'efficacité de la lutte anti-vectorielle contre *Aedes*.

Enfin, on peut concevoir, à moyen terme, l'évaluation du taux d'Ac anti-candidat marqueur d'exposition à partir d'un prélèvement capillaire au bout du doigt et l'utilisation de simple bandelette autoréactive. C'est dans ce cadre que nous avons déposé depuis janvier 2010 un brevet sur l'utilisation des protéines salivaires d'*Anopheles* (exemple le peptide gSG6-P1) comme biomarqueurs évaluant l'efficacité de la lutte anti-vectorielle.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abebe M., Ribeiro J. M., Cupp M. S. & Cupp E. W. 1996. Novel anticoagulant from salivary glands of Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor V. *J Med Entomol,* **33,** 173-6.

Ader D. B., Celluzzi C., Bisbing J., Gilmore L., Gunther V., Peachman K. K., Rao M., Barvir D., Sun W. & Palmer D. R. 2004. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by Aedes aegypti saliva. *Viral Immunol,* **17,** 252-65.

Afrane Y. A., Klinkenberg E., Drechsel P., Owusu-Daaku K., Garms R. & Kruppa T. 2004. Does irrigated urban agriculture influence the transmission of malaria in the city of Kumasi, Ghana? *Acta Trop,* **89,** 125-34.

Akogbeto M., Modiano D. & Bosman A. 1992. Malaria transmission in the lagoon area of Cotonou, Benin. *Parassitologia,* **34,** 147-54.

Akpogheneta O. J., Duah N. O., Tetteh K. K., Dunyo S., Lanar D. E., Pinder M. & Conway D. J. 2008. Duration of naturally acquired antibody responses to blood-stage Plasmodium falciparum is age dependent and antigen specific. *Infect Immun,* **76,** 1748-55.

Alarcon-Chaidez F. J., Sun J. & Wikel S. K. 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of Dermacentor andersoni Stiles (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol,* **37,** 48-71.

Alexander J., Satoskar A. R. & Russell D. G. 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci,* **112 Pt 18,** 2993-3002.

Alves-Silva J., Ribeiro J. M., Van Den Abbeele J., Attardo G., Hao Z., Haines L. R., Soares M. B., Berriman M., Aksoy S. & Lehane M. J. An insight into the sialome of Glossina morsitans morsitans. *BMC Genomics,* **11,** 213.

Amino R., Thiberge S., Shorte S., Frischknecht F. & Menard R. 2006. Quantitative imaging of Plasmodium sporozoites in the mammalian host. *C R Biol,* **329,** 858-62.

Andersen J. F., Hinnebusch B. J., Lucas D. A., Conrads T. P., Veenstra T. D., Pham V. M. & Ribeiro J. M. 2007. An insight into the sialome of the oriental rat flea, Xenopsylla cheopis (Rots). *BMC Genomics,* **8,** 102.

Andrade B. B., Rocha B. C., Reis-Filho A., Camargo L. M., Tadei W. P., Moreira L. A., Barral A. & Barral-Netto M. 2009. Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of Plasmodium vivax infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. *Malar J,* **8,** 121.

Andrade B. B., Teixeira C. R., Barral A. & Barral-Netto M. 2005. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. *An Acad Bras Cienc,* **77,** 665-93.

Arca B., Lombardo F., Capurro M., della Torre A., Spanos L., Dimopoulos G., Louis C., James A. A. & Coluzzi M. 1999. Salivary gland-specific gene expression in the malaria vector Anopheles gambiae. *Parassitologia,* **41,** 483-7.

Arca B., Lombardo F., Francischetti I. M., Pham V. M., Mestres-Simon M., Andersen J. F. & Ribeiro J. M. 2007. An insight into the sialome of the adult female mosquito Aedes albopictus. *Insect Biochem Mol Biol,* **37,** 107-27.

Arca B., Lombardo F., Valenzuela J. G., Francischetti I. M., Marinotti O., Coluzzi M. & Ribeiro J. M. 2005. An updated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Anopheles gambiae. *J Exp Biol,* **208,** 3971-86.

Assumpcao T. C., Francischetti I. M., Andersen J. F., Schwarz A., Santana J. M. & Ribeiro J. M. 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug Triatoma infestans, a vector of Chagas' disease. *Insect Biochem Mol Biol,* **38,** 213-32.

Baudon D., Louis F. J. & Martet G. 1996. [In Africa, urban malaria is the malaria of tomorrow]. *Med Trop (Mars),* **56,** 323-5.

Beare N. A., Taylor T. E., Harding S. P., Lewallen S. & Molyneux M. E. 2006. Malarial retinopathy: a newly established diagnostic sign in severe malaria. *Am J Trop Med Hyg,* **75,** 790-7.

Beck L. R., Lobitz B. M. & Wood B. L. 2000. Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. *Emerg Infect Dis,* **6,** 217-27.

Beck L. R., Rodriguez M. H., Dister S. W., Rodriguez A. D., Rejmankova E., Ulloa A., Meza R. A., Roberts D. R., Paris J. F., Spanner M. A. & et al. 1994. Remote sensing as a landscape epidemiologic tool to identify villages at high risk for malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg,* **51,** 271-80.

Beier J. 1998. Blood meal identification by direct Enzyme-Linked Immunosorbant Essay (ELISA) tested on Anopheles (Dipteria: Culicidae) in Kenya. *Journal of Medical Entomology,* **25,** 9-16.

Beier J. C., Keating J., Githure J. I., Macdonald M. B., Impoinvil D. E. & Novak R. J. 2008. Integrated vector

management for malaria control. *Malar J,* **7 Suppl 1,** S4.
Beier J. C., Killeen G. F. & Githure J. I. 1999. Short report: entomologic inoculation rates and Plasmodium falciparum malaria prevalence in Africa. *Am J Trop Med Hyg,* **61,** 109-13.
Belkaid Y., Butcher B. & Sacks D. L. 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol,* **28,** 1389-400.
Bergman D. K., Ramachandra R. N. & Wikel S. K. 1995. Dermacentor andersoni: salivary gland proteins suppressing T-lymphocyte responses to concanavalin A in vitro. *Exp Parasitol,* **81,** 262-71.
Bergman D. K., Ramachandra R. N. & Wikel S. K. 1998. Characterization of an immunosuppressant protein from Dermacentor andersoni (Acari: Ixodidae) salivary glands. *J Med Entomol,* **35,** 505-9.
Bhattarai A., Ali A. S., Kachur S. P., Martensson A., Abbas A. K., Khatib R., Al-Mafazy A. W., Ramsan M., Rotllant G., Gerstenmaier J. F., Molteni F., Abdulla S., Montgomery S. M., Kaneko A. & Bjorkman A. 2007. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med,* **4,** e309.
Bissonnette E. Y., Rossignol P. A. & Befus A. D. 1993. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. *Parasite Immunol,* **15,** 27-33.
Boisson B., Jacques J. C., Choumet V., Martin E., Xu J., Vernick K. & Bourgouin C. 2006. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS Lett,* **580,** 1988-92.
Boreham P. F. 1975. Some applications of bloodmeal identifications in relation to the epidemiology of vector-borne tropical diseases. *J Trop Med Hyg,* **78,** 83-91.
Boreham P. F. & Garrett-Jones C. 1973. Prevalence of mixed blood meals and double feeding in a malaria vector (Anopheles sacharovi Favre). *Bull World Health Organ,* **48,** 605-14.
Boyce J. A. 2004. The biology of the mast cell. *Allergy Asthma Proc,* **25,** 27-30.
Bozza M., Soares M. B., Bozza P. T., Satoskar A. R., Diacovo T. G., Brombacher F., Titus R. G., Shoemaker C. B. & David J. R. 1998. The PACAP-type I receptor agonist maxadilan from sand fly saliva protects mice against lethal endotoxemia by a mechanism partially dependent on IL-10. *Eur J Immunol,* **28,** 3120-7.
Brennan J. D., Kent M., Dhar R., Fujioka H. & Kumar N. 2000. Anopheles gambiae salivary gland proteins as putative targets for blocking transmission of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **97,** 13859-64.
Brossard M., Monneron J. P. & Papatheodorou V. 1982. Progressive sensitization of circulating basophils against Ixodes ricinus L. antigens during repeated infestations of rabbits. *Parasite Immunol,* **4,** 335-61.
Brossard M. & Wikel S. K. 1997. Immunology of interactions between ticks and hosts. *Med Vet Entomol,* **11,** 270-6.
Bruce-Chwatt L. J., Draper C. C., Avramidis D. & Kazandzoglou O. 1975. Sero-epidemiological surveillance of disappearing malaria in Greece. *J Trop Med Hyg,* **78,** 194-200.
Brummer-Korvenkontio H., Lappalainen P., Reunala T. & Palosuo T. 1994. Detection of mosquito saliva-specific IgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol,* **93,** 551-5.
Brummer-Korvenkontio H., Palosuo K., Palosuo T., Brummer-Korvenkontio M., Leinikki P. & Reunala T. 1997a. Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. *Allergy,* **52,** 342-5.
Brummer-Korvenkontio H., Palosuo T., Francois G. & Reunala T. 1997b. Characterization of Aedes communis, Aedes aegypti and Anopheles stephensi mosquito saliva antigens by immunoblotting. *Int Arch Allergy Immunol,* **112,** 169-74.
Brunelleschi S., Ceni E., Giotti A. & Fantozzi R. 1990a. Tachykinins stimulate lyso-PAF:acetyl-CoA acetyltransferase activity in neutrophils. *Eur J Pharmacol,* **186,** 367-8.
Brunelleschi S., Vanni L., Ledda F., Giotti A., Maggi C. A. & Fantozzi R. 1990b. Tachykinins activate guinea-pig alveolar macrophages: involvement of NK2 and NK1 receptors. *Br J Pharmacol,* **100,** 417-20.
Burgdorfer W. 1977. Tick-borne diseases in the United States: Rocky Mountain spotted fever and Colorado tick fever. A review. *Acta Trop,* **34,** 103-26.
Caljon G., Van Den Abbeele J., Sternberg J. M., Coosemans M., De Baetselier P. & Magez S. 2006. Tsetse fly saliva biases the immune response to Th2 and induces anti-vector antibodies that are a useful tool for exposure assessment. *Int J Parasitol,* **36,** 1025-35.
Calvo E., Dao A., Pham V. M. & Ribeiro J. M. 2007. An insight into the sialome of Anopheles funestus reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. *Insect Biochem Mol Biol,* **37,** 164-75.
Calvo E., Mans B. J., Andersen J. F. & Ribeiro J. M. 2006a. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. *J Biol Chem,* **281,** 1935-42.
Calvo E., Pham V. M., Lombardo F., Arca B. & Ribeiro J. M. 2006b. The sialotranscriptome of adult male Anopheles gambiae mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol,* **36,** 570-5.
Calvo E., Pham V. M., Marinotti O., Andersen J. F. & Ribeiro J. M. 2009. The salivary gland transcriptome of the

neotropical malaria vector Anopheles darlingi reveals accelerated evolution of genes relevant to hematophagy. *BMC Genomics,* **10,** 57.

Cappello M., Bergum P. W., Vlasuk G. P., Furmidge B. A., Pritchard D. I. & Aksoy S. 1996. Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of Glossina morsitans morsitans. *Am J Trop Med Hyg,* **54,** 475-80.

Carnevale P., Frezil J. L., Bosseno M. F., Le Pont F. & Lancien J. 1978. [The aggressiveness of Anopheles gambiae A in relation to the age and sex of the human subjects]. *Bull World Health Organ,* **56,** 147-54.

Carnevale P. & Mouchet J. 1980. Le paludisme en zone de transmission continue en Région afrotropicale. *Cahier ORSTOM, Entomol Med Parasitol,* **18,** 162-171.

Carnevale P. & Mouchet J. 1987. Prospects for malaria control. *Int J Parasitol,* **17,** 181-7.

Carnevale P., Robert V., Boudin C., Halna J. M., Pazart L., Gazin P., Richard A. & Mouchet J. 1988. [Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales,* **81,** 832-46.

Carnevale P., Robert V., Molez J. F. & Baudon D. 1984. Epidémiologie générale: faciès épidémiologique des paludismes en Afrique Subsaharienne. *Etudes Med,* **3,** 123-133.

Carnevale P., Robert V., Snow R., Curtis C., Richard A., Boudin C., Pazart L. H., Halna J. M. & Mouchet J. 1991. [The impact of impregnated mosquito nets on prevalence and morbidity related to malaria in sub-Saharan africa]. *Ann Soc Belg Med Trop,* **71 Suppl 1,** 127-50.

Carter R. & Miller L. H. 1979. Evidence for environmental modulation of gametocytogenesis in Plasmodium falciparum in continuous culture. *Bull World Health Organ,* **57 Suppl 1,** 37-52.

Cavalcante R. R., Pereira M. H. & Gontijo N. F. 2003. Anti-complement activity in the saliva of phlebotomine sand flies and other haematophagous insects. *Parasitology,* **127,** 87-93.

Cavassani K. A., Aliberti J. C., Dias A. R., Silva J. S. & Ferreira B. R. 2005. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology,* **114,** 235-45.

Challet G. L. 1991. Elements of a vector control program. *J Am Mosq Control Assoc,* **7,** 103-6.

Champagne D. E. 2004. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord,* **4,** 375-96.

Champagne D. E., Smartt C. T., Ribeiro J. M. & James A. A. 1995. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **92,** 694-8.

Chandre F., Darriet F., Manguin S., Brengues C., Carnevale P. & Guillet P. 1999. Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of Anopheles gambiae s.s. from Cote d'Ivoire. *J Am Mosq Control Assoc,* **15,** 53-9.

Charlab R., Valenzuela J. G., Rowton E. D. & Ribeiro J. M. 1999. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly Lutzomyia longipalpis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **96,** 15155-60.

Choumet V., Carmi-Leroy A., Laurent C., Lenormand P., Rousselle J. C., Namane A., Roth C. & Brey P. T. 2007. The salivary glands and saliva of Anopheles gambiae as an essential step in the Plasmodium life cycle: a global proteomic study. *Proteomics,* **7,** 3384-94.

Clements A. P. & Ferry J. G. 1992. Cloning, nucleotide sequence, and transcriptional analyses of the gene encoding a ferredoxin from Methanosarcina thermophila. *J Bacteriol,* **174,** 5244-50.

Clements M. F., Gidwani K., Kumar R., Hostomska J., Dinesh D. S., Kumar V., Das P., Muller I., Hamilton G., Volfova V., Boelaert M., Das M., Rijal S., Picado A., Volf P., Sundar S*., et al.* 2010. Measurement of recent exposure to Phlebotomus argentipes, the vector of Indian visceral Leishmaniasis, by using human antibody responses to sand fly saliva. *Am J Trop Med Hyg,* **82,** 801-7.

Coetzee M., Craig M. & le Sueur D. 2000. Distribution of African malaria mosquitoes belonging to the Anopheles gambiae complex. *Parasitol Today,* **16,** 74-7.

Coetzee M. & Fontenille D. 2004. Advances in the study of Anopheles funestus, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochem Mol Biol,* **34,** 599-605.

Collins F. H. & Paskewitz S. M. 1995. Malaria: current and future prospects for control. *Annu Rev Entomol,* **40,** 195-219.

Colman R. W. & Schmaier A. H. 1997. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood,* **90,** 3819-43.

Coluzzi M., Calabro M. L., Manno D., Chieco-Bianchi L., Schulz T. F. & Ascoli V. 2003. Reduced seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), human herpesvirus 8 (HHV8), related to suppression of Anopheles density in Italy. *Med Vet Entomol,* **17,** 461-4.

Condorelli F., Scalia G., Stivala A., Gallo R., Marino A., Battaglini C. M. & Castro A. 1994. Detection of immunoglobulin G to measles virus, rubella virus, and mumps virus in serum samples and in

microquantities of whole blood dried on filter paper. *J Virol Methods,* **49,** 25-36.
Cook S. P. & McCleskey E. W. 2002. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain,* **95,** 41-7.
Corbel V., Chabi J., Dabire R. K., Etang J., Nwane P., Pigeon O., Akogbeto M. & Hougard J. M. 2010. Field efficacy of a new mosaic long-lasting mosquito net (PermaNet 3.0) against pyrethroid-resistant malaria vectors: a multi centre study in Western and Central Africa. *Malar J,* **9,** 113.
Cornelie S., Remoue F., Doucoure S., Ndiaye T., Sauvage F. X., Boulanger D. & Simondon F. 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of Anopheles gambiae in African children. *Malar J,* **6,** 75.
Corran P., Coleman P., Riley E. & Drakeley C. 2007. Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? *Trends Parasitol,* **23,** 575-82.
Costa D. J., Favali C., Clarencio J., Afonso L., Conceicao V., Miranda J. C., Titus R. G., Valenzuela J., Barral-Netto M., Barral A. & Brodskyn C. I. 2004. Lutzomyia longipalpis salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun,* **72,** 1298-305.
Cross M. L., Cupp E. W. & Enriquez F. J. 1994. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of Aedes aegypti. *Am J Trop Med Hyg,* **51,** 690-6.
Cross M. L., Cupp M. S., Cupp E. W., Galloway A. L. & Enriquez F. J. 1993. Modulation of murine immunological responses by salivary gland extract of Simulium vittatum (Diptera: Simuliidae). *J Med Entomol,* **30,** 928-35.
Cuamba N., Choi K. S. & Townson H. 2006. Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the Anopheles gambiae complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (kdr) status and Plasmodium falciparum sporozoite rates. *Malar J,* **5,** 2.
Cupp M. S., Ribeiro J. M., Champagne D. E. & Cupp E. W. 1998. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, Simulium vittatum. *J Exp Biol,* **201,** 1553-61.
Dan A., Pereira M. H., Pesquero J. L., Diotaiuti L. & Beirao P. S. 1999. Action of the saliva of Triatoma infestans (Heteroptera: Reduviidae) on sodium channels. *J Med Entomol,* **36,** 875-9.
Darriet F. 1998. La lutte contre les moustiques nuisants et vecteurs de maladies. *Editions Karthala-ORSTOM*.
Darriet F., Guillet P., N'Guessan R., Doannio J. M., Koffi A., Konan L. Y. & Carnevale P. 1998. [Impact of resistance of Anopheles gambiae s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets]. *Med Trop (Mars),* **58,** 349-54.
Das M. K., Mishra A., Beuria M. K. & Dash A. P. 1991. Human natural antibodies to Culex quinquefasciatus: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc,* **7,** 319-21.
Davies C. R., Jones L. D. & Nuttall P. A. 1990. A comparative study of the infection thresholds of Thogoto virus in Rhipicephalus appendiculatus and Amblyomma variegatum. *Am J Trop Med Hyg,* **43,** 99-103.
Davies E. E. 1974. Ultrastructural studies on the early ookinete stage of Plasmodium berghei nigeriensis and its transformation into an oocyst. *Ann Trop Med Parasitol,* **68,** 283-90.
De Carvalho M. E., Ferreira M. U., De Souza M. R., Ninomia R. T., Matos G. F., Camargo L. M. & Ferreira C. S. 1992. Malaria seroepidemiology: comparison between indirect fluorescent antibody test and enzyme immunoassay using bloodspot eluates. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* **87,** 205-8.
De Pina J. J., Garnotel E., Hance P., Vedy S., Rogier C. & Morillon M. 2007. [Diagnosis of imported malaria in France]. *Med Mal Infect,* **37,** 710-5.
della Torre A., Fanello C., Akogbeto M., Dossou-yovo J., Favia G., Petrarca V. & Coluzzi M. 2001. Molecular evidence of incipient speciation within Anopheles gambiae s.s. in West Africa. *Insect Mol Biol,* **10,** 9-18.
Deloron P. & Chougnet C. 1992. Is immunity to malaria really short-lived? *Parasitol Today,* **8,** 375-8.
Deloron P., Gazin P., Abel L. & Larouze B. 1992. [Epidemiology of malaria: research priorities (excluding entomology)]. *Rev Epidemiol Sante Publique,* **40,** 227-32.
Delves P. J. & Roitt I. M. 2000. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med,* **343,** 37-49.
Demeure C. E., Brahimi K., Hacini F., Marchand F., Peronet R., Huerre M., St-Mezard P., Nicolas J. F., Brey P., Delespesse G. & Mecheri S. 2005. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. *J Immunol,* **174,** 3932-40.
Dia I., Konate L., Samb B., Sarr J. B., Diop A., Rogerie F., Faye M., Riveau G., Remoue F., Diallo M. & Fontenille D. 2008. Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Trop,* **105,** 145-53.
Diallo S., Konate L., Ndir O., Dieng T., Dieng Y., Bah I. B., Faye O. & Gaye O. 2000. [Malaria in the central health district of Dakar (Senegal). Entomological, parasitological and clinical data]. *Sante,* **10,** 221-9.

Diatta M., Spiegel A., Lochouarn L. & Fontenille D. 1998. Similar feeding preferences of Anopheles gambiae and A. arabiensis in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **92,** 270-2.

Djogbenou L., Pasteur N., Bio-Bangana S., Baldet T., Irish S. R., Akogbeto M., Weill M. & Chandre F. 2010. Malaria vectors in the Republic of Benin: distribution of species and molecular forms of the Anopheles gambiae complex. *Acta Trop,* **114,** 116-22.

Doannio J. M., Doudou D. T., Konan L. Y., Djouaka R., Pare Toe L., Baldet T., Akogbeto M. & Monjour L. 2006. [Influence of social perceptions and practices on the use of bednets in the malaria control programme in Ivory Coast (West Africa)]. *Med Trop (Mars),* **66,** 45-52.

Donovan M. J., Messmore A. S., Scrafford D. A., Sacks D. L., Kamhawi S. & McDowell M. A. 2007. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. *Infect Immun,* **75,** 2523-30.

Drakeley C. J., Corran P. H., Coleman P. G., Tongren J. E., McDonald S. L., Carneiro I., Malima R., Lusingu J., Manjurano A., Nkya W. M., Lemnge M. M., Cox J., Reyburn H. & Riley E. M. 2005. Estimating medium- and long-term trends in malaria transmission by using serological markers of malaria exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **102,** 5108-13.

Duchemin J. B., Tsy J. M., Rabarison P., Roux J., Coluzzi M. & Costantini C. 2001. Zoophily of Anopheles arabiensis and An. gambiae in Madagascar demonstrated by odour-baited entry traps. *Med Vet Entomol,* **15,** 50-7.

Edwards J. F., Higgs S. & Beaty B. J. 1998. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. *J Med Entomol,* **35,** 261-5.

Eglezos A., Andrews P. V., Boyd R. L. & Helme R. D. 1991. Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunol Cell Biol,* **69 (Pt 4),** 285-94.

Ekvall H. 2003. Malaria and anemia. *Curr Opin Hematol,* **10,** 108-14.

Ellis J. A., Shapiro S. Z., ole Moi-Yoi O. & Moloo S. K. 1986. Lesions and saliva-specific antibody responses in rabbits with immediate and delayed hypersensitivity reactions to the bites of Glossina morsitans centralis. *Vet Pathol,* **23,** 661-7.

Favia G., della Torre A., Bagayoko M., Lanfrancotti A., Sagnon N., Toure Y. T. & Coluzzi M. 1997. Molecular identification of sympatric chromosomal forms of Anopheles gambiae and further evidence of their reproductive isolation. *Insect Mol Biol,* **6,** 377-83.

Faye O., Fontenille D., Gaye O., Sy N., Molez J. F., Konate L., Hebrard G., Herve J. P., Trouillet J., Diallo S. & et al. 1995. [Malaria and rice growing in the Senegal River delta (Senegal)]. *Ann Soc Belg Med Trop,* **75,** 179-89.

Faye O., Konate L., Mouchet J., Fontenille D., Sy N., Hebrard G. & Herve J. P. 1997. Indoor resting by outdoor biting females of Anopheles gambiae complex (Diptera:Culicidae) in the Sahel of northern Senegal. *J Med Entomol,* **34,** 285-9.

Faye O., N'Dir B., Correa J., N'Dir O., Gaye O., Bah I. B., Dieng T., Dieng Y. & Diallo S. 1998. [Evaluation of parasitic risks related to the revitalization of the Ferlo fossil valley (Senegal)]. *Dakar Med,* **43,** 183-7.

Ferreira B. R. & Silva J. S. 1998. Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity. *Vet Immunol Immunopathol,* **64,** 279-93.

Ferreira B. R. & Silva J. S. 1999. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. *Immunology,* **96,** 434-9.

Fillinger U. & Lindsay S. W. 2006. Suppression of exposure to malaria vectors by an order of magnitude using microbial larvicides in rural Kenya. *Trop Med Int Health,* **11,** 1629-42.

Fivaz B. H. 1989. Immune suppression induced by the brown ear tick Rhipicephalus appendiculatus Neumann, 1901. *J Parasitol,* **75,** 946-52.

Fortes F. 2000a. Rapport sur la lutte antipaludique en Angola. *Observatoire de la Santé en Afrique, OMS Afrique*.

Fortes F. 2000b. Rapport sur la lutte antipaludique en Angola. *Observatoire de la Santé en Afrique, OMS Afrique.,* **1**.

Foster W. A. 1995. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu Rev Entomol,* **40,** 443-74.

Francischetti I. M. 2009. Platelet aggregation inhibitors from hematophagous animals. *Toxicon*.

Francischetti I. M., Andersen J. F. & Ribeiro J. M. 2002a. Biochemical and functional characterization of recombinant Rhodnius prolixus platelet aggregation inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. *Biochemistry,* **41,** 3810-8.

Francischetti I. M., Sa-Nunes A., Mans B. J., Santos I. M. & Ribeiro J. M. 2009. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci,* **14,** 2051-88.

Francischetti I. M., Valenzuela J. G., Pham V. M., Garfield M. K. & Ribeiro J. M. 2002b. Toward a catalog for the transcripts and proteins (sialome) from the salivary gland of the malaria vector Anopheles gambiae. *J*

Exp Biol, **205,** 2429-51.
Francischetti I. M., Valenzuela J. G. & Ribeiro J. M. 1999. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry,* **38,** 16678-85.
Fuchsberger N., Kita M., Hajnicka V., Imanishi J., Labuda M. & Nuttall P. A. 1995. Ixodid tick salivary gland extracts inhibit production of lipopolysaccharide-induced mRNA of several different human cytokines. *Exp Appl Acarol,* **19,** 671-6.
Gazin P., Robert V., Cot M., Simon J., Halna J. M., Darriet F., Legrand D., Carnevale P. & Ambroise-Thomas P. 1988. [Malaria in Oudalan, a Sahelian region of Burkina Faso]. *Ann Soc Belg Med Trop,* **68,** 255-64.
Geissbuhler Y., Chaki P., Emidi B., Govella N. J., Shirima R., Mayagaya V., Mtasiwa D., Mshinda H., Fillinger U., Lindsay S. W., Kannady K., de Castro M. C., Tanner M. & Killeen G. F. 2007. Interdependence of domestic malaria prevention measures and mosquito-human interactions in urban Dar es Salaam, Tanzania. *Malar J,* **6,** 126.
Genton B., Smith T., Baea K., Narara A., al-Yaman F., Beck H. P., Hii J. & Alpers M. 1994. Malaria: how useful are clinical criteria for improving the diagnosis in a highly endemic area? *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **88,** 537-41.
Ghosh A., Edwards M. J. & Jacobs-Lorena M. 2000. The journey of the malaria parasite in the mosquito: hopes for the new century. *Parasitol Today,* **16,** 196-201.
Gillespie R. D., Mbow M. L. & Titus R. G. 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol,* **22,** 319-31.
Gitlin D. & Boesman M. 1966. Serum alpha-fetoprotein, albumin, and gamma-G-globulin in the human conceptus. *J Clin Invest,* **45,** 1826-38.
Gomes R. B., Brodskyn C., de Oliveira C. I., Costa J., Miranda J. C., Caldas A., Valenzuela J. G., Barral-Netto M. & Barral A. 2002. Seroconversion against Lutzomyia longipalpis saliva concurrent with the development of anti-Leishmania chagasi delayed-type hypersensitivity. *J Infect Dis,* **186,** 1530-4.
Gordon R. M. & Crewe W. 1948. The mechanisms by which mosquitoes and tsetse-flies obtain their blood-meal, the histology of the lesions produced, and the subsequent reactions of the mammalian host; together with some observations on the feeding of Chrysops and Cimex. *Ann Trop Med Parasitol,* **42,** 334-56.
Greenwood B. & Targett G. 2009. Do we still need a malaria vaccine? *Parasite Immunol,* **31,** 582-6.
Greenwood B. M., Bojang K., Whitty C. J. & Targett G. A. 2005. Malaria. *Lancet,* **365,** 1487-98.
Greenwood B. M., Fidock D. A., Kyle D. E., Kappe S. H., Alonso P. L., Collins F. H. & Duffy P. E. 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J Clin Invest,* **118,** 1266-76.
Grevelink S. A., Osborne J., Loscalzo J. & Lerner E. A. 1995. Vasorelaxant and second messenger effects of maxadilan. *J Pharmacol Exp Ther,* **272,** 33-7.
Grossman G. L., Campos Y., Severson D. W. & James A. A. 1997. Evidence for two distinct members of the amylase gene family in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. *Insect Biochem Mol Biol,* **27,** 769-81.
Guerra C. A., Gikandi P. W., Tatem A. J., Noor A. M., Smith D. L., Hay S. I. & Snow R. W. 2008. The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med,* **5,** e38.
Guillet P., Alnwick D., Cham M. K., Neira M., Zaim M., Heymann D. & Mukelabai K. 2001. Long-lasting treated mosquito nets: a breakthrough in malaria prevention. *Bull World Health Organ,* **79,** 998.
Guyatt H. L. & Snow R. W. 2001. The epidemiology and burden of Plasmodium falciparum-related anemia among pregnant women in sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg,* **64,** 36-44.
Hajnicka V., Vancova I., Kocakova P., Slovak M., Gasperik J., Slavikova M., Hails R. S., Labuda M. & Nuttall P. A. 2005. Manipulation of host cytokine network by ticks: a potential gateway for pathogen transmission. *Parasitology,* **130,** 333-42.
Haldar K. & Mohandas N. 2009. Malaria, erythrocytic infection, and anemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program***,** 87-93.
Hall L. R. & Titus R. G. 1995. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of Leishmania major and nitric oxide production. *J Immunol,* **155,** 3501-6.
Hasker E., Mitashi P., Baelmans R., Lutumba P., Jacquet D., Lejon V., Kande V., Declercq J., Van der Veken W. & Boelaert M. 2010. A new format of the CATT test for the detection of human African Trypanosomiasis, designed for use in peripheral health facilities. *Trop Med Int Health,* **15,** 263-7.
Havlikova S., Roller L., Koci J., Trimnell A. R., Kazimirova M., Klempa B. & Nuttall P. A. 2009. Functional role of 64P, the candidate transmission-blocking vaccine antigen from the tick, Rhipicephalus appendiculatus. *Int J Parasitol,* **39,** 1485-94.
Hawley W. A., Phillips-Howard P. A., ter Kuile F. O., Terlouw D. J., Vulule J. M., Ombok M., Nahlen B. L., Gimnig

J. E., Kariuki S. K., Kolczak M. S. & Hightower A. W. 2003. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg,* **68,** 121-7.

Hay S. I., Guerra C. A., Tatem A. J., Atkinson P. M. & Snow R. W. 2005. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. *Nat Rev Microbiol,* **3,** 81-90.

Hay S. I., Smith D. L. & Snow R. W. 2008. Measuring malaria endemicity from intense to interrupted transmission. *Lancet Infect Dis,* **8,** 369-78.

Hemingway J. 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol,* **30,** 1009-15.

Hemingway J. & Ranson H. 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol,* **45,** 371-91.

Hill A. V. 2006. Pre-erythrocytic malaria vaccines: towards greater efficacy. *Nat Rev Immunol,* **6,** 21-32.

Hirai M., Wang J., Yoshida S., Ishii A. & Matsuoka H. 2001. Characterization and identification of exflagellation-inducing factor in the salivary gland of Anopheles stephensi (Diptera: Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun,* **287,** 859-64.

Holt R. A.Subramanian G. M.Halpern A.Sutton G. G.Charlab R.Nusskern D. R.Wincker P.Clark A. G.Ribeiro J. M.Wides R.Salzberg S. L.Loftus B.Yandell M.Majoros W. H.Rusch D. B.Lai Z.*, et al.* 2002. The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. *Science,* **298,** 129-49.

Hougard J. M., Fontenille D., Chandre F., Darriet F., Carnevale P. & Guillet P. 2002. Combating malaria vectors in Africa: current directions of research. *Trends Parasitol,* **18,** 283-6.

Isawa H., Yuda M., Orito Y. & Chinzei Y. 2002. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. *J Biol Chem,* **277,** 27651-8.

Jambulingam P., Gunasekaran K., Sahu S. & Vijayakumar T. 2008. Insecticide treated mosquito nets for malaria control in India-experience from a tribal area on operational feasibility and uptake. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* **103,** 165-71.

James A. A. 1994. Molecular and biochemical analysis of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin Institute Pasteur* **92 1,** 33-150.

James A. A., Blackmer K., Marinotti O., Ghosn C. R. & Racioppi J. V. 1991. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, Aedes aegypti. *Mol Biochem Parasitol,* **44,** 245-53.

Jeon S. H., Park J. W. & Lee B. H. 2001. Characterization of human IgE and mouse IgG1 responses to allergens in three mosquito species by immunoblotting and ELISA. *Int Arch Allergy Immunol,* **126,** 206-12.

Jiang J. B., Bray R. S., Krotoski W. A., Canning E. U., Liang D. S., Huang J. C., Liao J. Y., Li D. S., Lun Z. R. & Landau I. 1988. Observations on early and late post-sporozoite tissue stages in primate malaria. V. The effect of pyrimethamine and proguanil upon tissue hypnozoites and schizonts of Plasmodium cynomolgi bastianellii. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **82,** 56-8.

Jordan S. P., Waxman L., Smith D. E. & Vlasuk G. P. 1990. Tick anticoagulant peptide: kinetic analysis of the recombinant inhibitor with blood coagulation factor Xa. *Biochemistry,* **29,** 11095-100.

Josse R., Foundohou J., Helynck B. & Lawson V. 1994. [Benin: from the Bamako initiative to eradication of the Guinea worm...]. *Med Trop (Mars),* **54,** 113-6.

Kalluri S., Gilruth P., Rogers D. & Szczur M. 2007. Surveillance of arthropod vector-borne infectious diseases using remote sensing techniques: a review. *PLoS Pathog,* **3,** 1361-71.

Kalume D. E., Okulate M., Zhong J., Reddy R., Suresh S., Deshpande N., Kumar N. & Pandey A. 2005a. A proteomic analysis of salivary glands of female Anopheles gambiae mosquito. *Proteomics,* **5,** 3765-77.

Kalume D. E., Peri S., Reddy R., Zhong J., Okulate M., Kumar N. & Pandey A. 2005b. Genome annotation of Anopheles gambiae using mass spectrometry-derived data. *BMC Genomics,* **6,** 128.

Kalvachova P., Hribalova V., Kodym P. & Volf P. 1999. Modulation of murine lymphocyte responsiveness by the saliva of Rhodnius prolixus (Hemiptera: Reduviidae). *J Med Entomol,* **36,** 341-4.

Kamhawi S. 2000. The biological and immunomodulatory properties of sand fly saliva and its role in the establishment of Leishmania infections. *Microbes Infect,* **2,** 1765-73.

Keevil B. G. 2010. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin Biochem*.

Keiser J., Singer B. H. & Utzinger J. 2005. Reducing the burden of malaria in different eco-epidemiological settings with environmental management: a systematic review. *Lancet Infect Dis,* **5,** 695-708.

Keiser J., Utzinger J., Caldas de Castro M., Smith T. A., Tanner M. & Singer B. H. 2004. Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control. *Am J Trop Med Hyg,* **71,** 118-27.

Kemper C., Atkinson J. P. & Hourcade D. E. 2010. Properdin: emerging roles of a pattern-recognition molecule. *Annu Rev Immunol,* **28,** 131-55.

Killeen G. F., Fillinger U. & Knols B. G. 2002. Advantages of larval control for African malaria vectors: low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. *Malar J,* **1,** 8.

Kinyanjui S. M., Conway D. J., Lanar D. E. & Marsh K. 2007. IgG antibody responses to Plasmodium falciparum merozoite antigens in Kenyan children have a short half-life. *Malar J,* **6,** 82.

Kiszewski A., Mellinger A., Spielman A., Malaney P., Sachs S. E. & Sachs J. 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *Am J Trop Med Hyg,* **70,** 486-98.

Kitua A. Y., Smith T. A., Alonso P. L., Urassa H., Masanja H., Kimario J. & Tanner M. 1997. The role of low level Plasmodium falciparum parasitaemia in anaemia among infants living in an area of intense and perennial transmission. *Trop Med Int Health,* **2,** 325-33.

Knudsen A. B. & Slooff R. 1992. Vector-borne disease problems in rapid urbanization: new approaches to vector control. *Bull World Health Organ,* **70,** 1-6.

Konik P., Slavikova V., Salat J., Reznickova J., Dvoroznakova E. & Kopecky J. 2006. Anti-tumour necrosis factor-alpha activity in Ixodes ricinus saliva. *Parasite Immunol,* **28,** 649-56.

Kovar L. 2004. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. *Folia Microbiol (Praha),* **49,** 327-36.

Kwiatkowski D. & Marsh K. 1997. Development of a malaria vaccine. *Lancet,* **350,** 1696-701.

Lane R. S., Moss R. B., Hsu Y. P., Wei T., Mesirow M. L. & Kuo M. M. 1999. Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg,* **61,** 850-9.

Lanfrancotti A., Lombardo F., Santolamazza F., Veneri M., Castrignano T., Coluzzi M. & Arca B. 2002. Novel cDNAs encoding salivary proteins from the malaria vector Anopheles gambiae. *FEBS Lett,* **517,** 67-71.

Langner K. F., Darpel K. E., Denison E., Drolet B. S., Leibold W., Mellor P. S., Mertens P. P., Nimtz M. & Greiser-Wilke I. 2007. Collection and analysis of salivary proteins from the biting midge Culicoides nubeculosus (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol,* **44,** 238-48.

Lanzaro G. C., Lopes A. H., Ribeiro J. M., Shoemaker C. B., Warburg A., Soares M. & Titus R. G. 1999. Variation in the salivary peptide, maxadilan, from species in the Lutzomyia longipalpis complex. *Insect Mol Biol,* **8,** 267-75.

Laurenti M. D., da Matta V. L., Pernichelli T., Secundino N. F., Pinto L. C., Corbett C. E. & Pimenta P. P. 2009a. Effects of salivary gland homogenate from wild-caught and laboratory-reared Lutzomyia longipalpis on the evolution and immunomodulation of Leishmania (Leishmania) amazonensis infection. *Scand J Immunol,* **70,** 389-95.

Laurenti M. D., Silveira V. M., Secundino N. F., Corbett C. E. & Pimenta P. P. 2009b. Saliva of laboratory-reared Lutzomyia longipalpis exacerbates Leishmania (Leishmania) amazonensis infection more potently than saliva of wild-caught Lutzomyia longipalpis. *Parasitol Int,* **58,** 220-6.

Le Goff G., Carnevale P. & Robert V. 1993. [Comparison of catches by landings on humans and by CDC light traps for sampling of mosquitoes and evaluation of malaria transmission in South Cameroon]. *Ann Soc Belg Med Trop,* **73,** 55-60.

Le Menach A., McKenzie F. E., Flahault A. & Smith D. L. 2005. The unexpected importance of mosquito oviposition behaviour for malaria: non-productive larval habitats can be sources for malaria transmission. *Malar J,* **4,** 23.

Le Menach A., Takala S., McKenzie F. E., Perisse A., Harris A., Flahault A. & Smith D. L. 2007. An elaborated feeding cycle model for reductions in vectorial capacity of night-biting mosquitoes by insecticide-treated nets. *Malar J,* **6,** 10.

Lehane M. J. & Msangi A. R. 1991. Lectin and peritrophic membrane development in the gut of Glossina m.morsitans and a discussion of their role in protecting the fly against trypanosome infection. *Med Vet Entomol,* **5,** 495-501.

Lengeler C. 2004. Insecticide-treated nets for malaria control: real gains. *Bull World Health Organ,* **82,** 84.

Lerner E. A., Ribeiro J. M., Nelson R. J. & Lerner M. R. 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly Lutzomyia longipalpis. *J Biol Chem,* **266,** 11234-6.

Li S., Kwon J. & Aksoy S. 2001. Characterization of genes expressed in the salivary glands of the tsetse fly, Glossina morsitans morsitans. *Insect Mol Biol* **10** 69-76.

Lima H. C. & Titus R. G. 1996. Effects of sand fly vector saliva on development of cutaneous lesions and the immune response to Leishmania braziliensis in BALB/c mice. *Infect Immun,* **64,** 5442-5.

Lindsay S. W., Parson L. & Thomas C. J. 1998. Mapping the ranges and relative abundance of the two principal African malaria vectors, Anopheles gambiae sensu stricto and An. arabiensis, using climate data. *Proc*

Biol Sci, **265,** 847-54.
Lines J. 1996. Review: mosquito nets and insecticides for net treatment: a discussion of existing and potential distribution systems in Africa. *Trop Med Int Health,* **1,** 616-32.
Liyou N., Hamilton S., Elvin C. & Willadsen P. 1999. Cloning and expression of ecto 5-nucleotidase from the cattle tick Boophilus microplus. *Insect Mol Biol,* **8,** 257-66.
Looareesuwan S., Ho M., Wattanagoon Y., White N. J., Warrell D. A., Bunnag D., Harinasuta T. & Wyler D. J. 1987. Dynamic alteration in splenic function during acute falciparum malaria. *N Engl J Med,* **317,** 675-9.
Macaluso K. R. & Wikel S. K. 2001. Dermacentor andersoni: effects of repeated infestations on lymphocyte proliferation, cytokine production, and adhesion-molecule expression by BALB/c mice. *Ann Trop Med Parasitol,* **95,** 413-27.
Machault V., Gadiaga L., Vignolles C., Jarjaval F., Bouzid S., Sokhna C., Lacaux J. P., Trape J. F., Rogier C. & Pages F. 2009. Highly focused anopheline breeding sites and malaria transmission in Dakar. *Malar J,* **8,** 138.
Magesa S. M., Wilkes T. J., Mnzava A. E., Njunwa K. J., Myamba J., Kivuyo M. D., Hill N., Lines J. D. & Curtis C. F. 1991. Trial of pyrethroid impregnated bednets in an area of Tanzania holoendemic for malaria. Part 2. Effects on the malaria vector population. *Acta Trop,* **49,** 97-108.
Magnarelli L. A., Dumler J. S., Anderson J. F., Johnson R. C. & Fikrig E. 1995. Coexistence of antibodies to tick-borne pathogens of babesiosis, ehrlichiosis, and Lyme borreliosis in human sera. *J Clin Microbiol,* **33,** 3054-7.
Malafronte Rdos S., Calvo E., James A. A. & Marinotti O. 2003. The major salivary gland antigens of Culex quinquefasciatus are D7-related proteins. *Insect Biochem Mol Biol,* **33,** 63-71.
Roll Back Malaria. 2005. The Global Strategic Plan Roll Back Malaria 2005-2015**. Available in:** *www.rbm.who.int/*
Malkin E., Dubovsky F. & Moree M. 2006. Progress towards the development of malaria vaccines. *Trends Parasitol,* **22,** 292-5.
Manguin S., Garros C., Dusfour I., Harbach R. E. & Coosemans M. 2008. Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of Anopheles subgenus Cellia in Southeast Asia: an updated review. *Infect Genet Evol,* **8,** 489-503.
Marinotti O., de Brito M. & Moreira C. K. 1996. Apyrase and alpha-glucosidase in the salivary glands of Aedes albopictus. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol,* **113,** 675-9.
Martens P. & Hall L. 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. *Emerg Infect Dis,* **6,** 103-9.
Mathenge E. M., Gimnig J. E., Kolczak M., Ombok M., Irungu L. W. & Hawley W. A. 2001. Effect of permethrin-impregnated nets on exiting behavior, blood feeding success, and time of feeding of malaria mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya. *J Med Entomol,* **38,** 531-6.
Mathews G. V., Sidjanski S. & Vanderberg J. P. 1996. Inhibition of mosquito salivary gland apyrase activity by antibodies produced in mice immunized by bites of Anopheles stephensi mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg,* **55,** 417-23.
Matthys B., N'Goran E. K., Kone M., Koudou B. G., Vounatsou P., Cisse G., Tschannen A. B., Tanner M. & Utzinger J. 2006a. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Cote d'Ivoire. *J Vector Ecol,* **31,** 319-33.
Matthys B., Vounatsou P., Raso G., Tschannen A. B., Becket E. G., Gosoniu L., Cisse G., Tanner M., N'Goran E K. & Utzinger J. 2006b. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. *Am J Trop Med Hyg,* **75,** 1223-31.
Maxwell C. A., Myamba J., Njunwa K. J., Greenwood B. M. & Curtis C. F. 1999. Comparison of bednets impregnated with different pyrethroids for their impact on mosquitoes and on re-infection with malaria after clearance of pre-existing infections with chlorproguanil-dapsone. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **93,** 4-11.
Mboera L. E., Kihonda J., Braks M. A. & Knols B. G. 1998. Short report: Influence of centers for disease control light trap position, relative to a human-baited bed net, on catches of Anopheles gambiae and Culex quinquefasciatus in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg,* **59,** 595-6.
Mbogo C. N., Glass G. E., Forster D., Kabiru E. W., Githure J. I., Ouma J. H. & Beier J. C. 1993. Evaluation of light traps for sampling anopheline mosquitoes in Kilifi, Kenya. *J Am Mosq Control Assoc,* **9,** 260-3.
Mbow M. L., Bleyenberg J. A., Hall L. R. & Titus R. G. 1998. Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysate down-regulates a Th1, but up-regulates a Th2, response in mice infected with Leishmania major. *J Immunol,* **161,** 5571-7.
Mbow M. L., Rutti B. & Brossard M. 1994. IFN-gamma IL-2, and IL-4 mRNA expression in the skin and draining

lymph nodes of BALB/c mice repeatedly infested with nymphal Ixodes ricinus ticks. *Cell Immunol,* **156,** 254-61.

McCall P. J., Mosha F. W., Njunwa K. J. & Sherlock K. 2001. Evidence for memorized site-fidelity in Anopheles arabiensis. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **95,** 587-90.

McIver S. B. 1982. Sensilla mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol,* **19,** 489-535.

McSorley S., Proudfoot L., O'Donnell C. A. & Liew F. Y. 1996. Immunology of murine leishmaniasis. *Clin Dermatol,* **14,** 451-64.

Mellink J. J. & Van Den Bovenkamp W. 1981. Functional aspects of mosquito salivation in blood feeding of *Aedes aegypti*. *Mosquito News* **41,** 115-119.

Menon J. N. & Bretscher P. A. 1996. Characterization of the immunological memory state generated in mice susceptible to Leishmania major following exposure to low doses of L. major and resulting in resistance to a normally pathogenic challenge. *Eur J Immunol,* **26,** 243-9.

Millan M. J. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol,* **57,** 1-164.

Milleron R. S., Mutebi J. P., Valle S., Montoya A., Yin H., Soong L. & Lanzaro G. C. 2004a. Antigenic diversity in maxadilan, a salivary protein from the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg,* **70,** 286-93.

Milleron R. S., Ribeiro J. M., Elnaime D., Soong L. & Lanzaro G. C. 2004b. Negative effect of antibodies against maxadilan on the fitness of the sand fly vector of American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg,* **70,** 278-85.

Molineaux L. 1997. Malaria and mortality: some epidemiological considerations. *Ann Trop Med Parasitol,* **91,** 811-25.

Moore J. S., Kelly T. B., Killick-Kendrick R., Killick-Kendrick M., Wallbanks K. R. & Molyneux D. H. 1987. Honeydew sugars in wild-caught Phlebotomus ariasi detected by high performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). *Med Vet Entomol,* **1,** 427-34.

Morris R. V., Shoemaker C. B., David J. R., Lanzaro G. C. & Titus R. G. 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with Leishmania major and vaccinating against it protects against L. major infection. *J Immunol,* **167,** 5226-30.

Mouchet J., Carnevale P., Coosemans M., Julvez J., Manguin S., Richard-Lenoble D. & Sircoulon J. 2004. Biodiversité du paludisme dans le monde.

Murphy S. C. & Breman J. G. 2001. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am J Trop Med Hyg,* **64,** 57-67.

Murray C. K., Gasser R. A., Jr., Magill A. J. & Miller R. S. 2008. Update on rapid diagnostic testing for malaria. *Clin Microbiol Rev,* **21,** 97-110.

Nascimento E. P., dos Santos Malafronte R. & Marinotti O. 2000. Salivary gland proteins of the mosquito Culex quinquefasciatus. *Arch Insect Biochem Physiol,* **43,** 9-15.

Nascimento R. J., Santana J. M., Lozzi S. P., Araujo C. N. & Teixeira A. R. 2001. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg,* **65,** 219-26.

Ndungu J. M., Lu Y. J., Zhu S., Yang C., Wang X., Chen G., Shin D. M., Snyder J. P., Shoji M. & Sun A. 2010. Targeted delivery of paclitaxel to tumor cells: synthesis and in vitro evaluation. *J Med Chem,* **53,** 3127-32.

Nevill C. G., Some E. S., Mung'ala V. O., Mutemi W., New L., Marsh K., Lengeler C. & Snow R. W. 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health,* **1,** 139-46.

Newton C. R., Hien T. T. & White N. 2000. Cerebral malaria. *J Neurol Neurosurg Psychiatry,* **69,** 433-41.

Nobile M., Noceti F., Prestipino G. & Possani L. D. 1996. Helothermine, a lizard venom toxin, inhibits calcium current in cerebellar granules. *Exp Brain Res,* **110,** 15-20.

Noor A. M., Mutheu J. J., Tatem A. J., Hay S. I. & Snow R. W. 2009. Insecticide-treated net coverage in Africa: mapping progress in 2000-07. *Lancet,* **373,** 58-67.

O'Flaherty J. T. & Cordes J. F. 1994. Human neutrophil degranulation responses to nucleotides. *Lab Invest,* **70,** 816-21.

Odiere M., Bayoh M. N., Gimnig J., Vulule J., Irungu L. & Walker E. 2007. Sampling outdoor, resting Anopheles gambiae and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in western Kenya with clay pots. *J Med Entomol,* **44,** 14-22.

Oliveira C. J., Carvalho W. A., Garcia G. R., Gutierrez F. R., de Miranda Santos I. K., Silva J. S. & Ferreira B. R. 2010. Tick saliva induces regulatory dendritic cells: MAP-kinases and Toll-like receptor-2 expression as

potential targets. *Vet Parasitol,* **167,** 288-97.
Oliveira F., Lawyer P. G., Kamhawi S. & Valenzuela J. G. 2008. Immunity to distinct sand fly salivary proteins primes the anti-Leishmania immune response towards protection or exacerbation of disease. *PLoS Negl Trop Dis,* **2,** e226.
Orlandi-Pradines E., Almeras L., Denis de Senneville L., Barbe S., Remoue F., Villard C., Cornelie S., Penhoat K., Pascual A., Bourgouin C., Fontenille D., Bonnet J., Corre-Catelin N., Reiter P., Pages F., Laffite D.*, et al.* 2007. Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa. *Microbes Infect,* **9,** 1454-62.
Otranto D., Stevens J. R., Cantacessi C. & Gasser R. B. 2007. Parasite transmission by insects: a female affair? *Trends in Parasitology,* **24,** 116-120.
Owhashi M., Taoka Y., Ishii K., Nakazawa S., Uemura H. & Kambara H. 2003. Identification of a ubiquitin family protein as a novel neutrophil chemotactic factor. *Biochem Biophys Res Commun,* **309,** 533-9.
Owino E. A. 2010. Trapping mosquitoes using milk products as odour baits in western Kenya. *Parasit Vectors,* **3,** 55.
Oyewole I. O. & Awolola T. S. 2006. Impact of urbanisation on bionomics and distribution of malaria vectors in Lagos, southwestern Nigeria. *J Vector Borne Dis,* **43,** 173-8.
Paesen G. C., Adams P. L., Harlos K., Nuttall P. A. & Stuart D. I. 1999. Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning, and three-dimensional structure. *Mol Cell,* **3,** 661-71.
Pages F., Orlandi-Pradines E. & Corbel V. 2007. [Vectors of malaria: biology, diversity, prevention, and individual protection]. *Med Mal Infect,* **37,** 153-61.
Pages F., Texier G., Pradines B., Gadiaga L., Machault V., Jarjaval F., Penhoat K., Berger F., Trape J. F., Rogier C. & Sokhna C. 2008. Malaria transmission in Dakar: a two-year survey. *Malar J,* **7,** 178.
Palosuo K., Brummer-Korvenkontio H., Mikkola J., Sahi T. & Reunala T. 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to Aedes mosquito bites. *Int Arch Allergy Immunol,* **114,** 367-72.
Parker K. R. & Mant M. J. 1979. Effects of tsetse (Glossina morsitans morsitans Westw.) (Diptera: Glossinidae) salivary gland homogenate on coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost,* **42,** 743-51.
Pechova J., Stepanova G., Kovar L. & Kopecky J. 2002. Tick salivary gland extract-activated transmission of Borrelia afzelii spirochaetes. *Folia Parasitol (Praha),* **49,** 153-9.
Peng Z. & Simons F. E. 2004. Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. *Int Arch Allergy Immunol,* **133,** 198-209.
Peng Z. & Simons F. E. 2007. Advances in mosquito allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol,* **7,** 350-4.
Peng Z., Yang M. & Simons F. E. 1995. Measurement of mosquito Aedes vexans salivary gland-specific IgE and IgG antibodies and the distribution of these antibodies in human sera. *Ann Allergy Asthma Immunol,* **74,** 259-64.
Perez de Leon A. A., Valenzuela J. G. & Tabachnick W. J. 1998. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector Culicoides variipennis sonorensis by an inhibitor of factor Xa. *Exp Parasitol,* **88,** 121-30.
PNLP-Sénégal 2009. Enquête Nationale sur le Paludisme 2008-2009. Available in: http://www.pnlp.sn/index.php?dgcnet=mediatheque
PNLP-Sénégal 2010. Situation du paludisme au Sénégal (résumé). Available in: http://www.pnlp.sn/index.php?dgcnet=mediatheque
Poinsignon A., Cornelie S., Ba F., Boulanger D., Sow C., Rossignol M., Sokhna C., Cisse B., Simondon F. & Remoue F. 2009. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites. *Malar J,* **8,** 198.
Poinsignon A., Cornelie S., Mestres-Simon M., Lanfrancotti A., Rossignol M., Boulanger D., Cisse B., Sokhna C., Arca B., Simondon F. & Remoue F. 2008a. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. *PLoS One,* **3,** e2472.
Poinsignon A., Cornelie S., Remoue F., Grebaut P., Courtin D., Garcia A. & Simondon F. 2007. Human/vector relationships during human African trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of Glossina species. *Am J Trop Med Hyg,* **76,** 327-33.
Poinsignon A., Remoue F., Rossignol M., Cornelie S., Courtin D., Grebaut P., Garcia A. & Simondon F. 2008b. Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. *Am J Trop Med Hyg,* **78,** 750-3.
Pomelova V. G. & Osin N. S. 2007. [Prospects of the integration of dry blood spot technology with human health and environmental population studies]. *Vestn Ross Akad Med Nauk***,** 10-6.
Poulin R. 1995. "Adaptive" changes in the behaviour of parasitized animals: a critical review. *Int J Parasitol,* **25,** 1371-83.
Pradhan P. 2009. Malarial anaemia and nitric oxide induced megaloblastic anaemia: a review on the causes of

malarial anaemia. *J Vector Borne Dis,* **46,** 100-8.
Prates D. B., Santos L. D., Miranda J. C., Souza A. P., Palma M. S., Barral-Netto M. & Barral A. 2008. Changes in amounts of total salivary gland proteins of Lutzomyia longipallpis (Diptera: Psychodidae) according to age and diet. *J Med Entomol,* **45,** 409-13.
Qureshi A. A., Asahina A., Ohnuma M., Tajima M., Granstein R. D. & Lerner E. A. 1996. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. *Am J Trop Med Hyg,* **54,** 665-71.
Rabarison P., Ramambanirina L., Rajaonarivelo E., Rakotoarivony I., Andrianaivolambo L., Jambou R., Lepers J. P. & Laventure S. 1995. [Study of the impact of deltamethrin impregnated curtains on malaria morbidity in Ankazobe of the Madagascar highlands]. *Med Trop (Mars),* **55,** 105-8.
Ramachandra R. N. & Wikel S. K. 1992. Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. *J Med Entomol,* **29,** 818-26.
Ranson H., N'Guessan R., Lines J., Moiroux N., Nkuni Z. & Corbel V. 2010. Pyrethroid resistance in African anopheline mosquitoes: what are the implications for malaria control? *Trends Parasitol*.
Rawat D., Chakravarti A. & Yadav S. 2001. Comparison of two blood collection techniques for measles antibody detection in children. *Indian J Med Res,* **114,** 117-20.
Remoue F., Alix E., Cornelie S., Sokhna C., Cisse B., Doucoure S., Mouchet F., Boulanger D. & Simondon F. 2007. IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. *Acta Trop,* **104,** 108-15.
Remoue F., Cisse B., Ba F., Sokhna C., Herve J. P., Boulanger D. & Simondon F. 2006. Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **100,** 363-70.
Remoue F., Cornelie S., Ngom A., Boulanger D. & Simondon F. 2005. Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. *In Update in tropical immunology Edited by: Garraud O. Fort P.O. Trivandrum, Herala, India: Transworld research Network***,** 377-400.
Reunala T., Brummer-Korvenkontio H., Palosuo K., Miyanij M., Ruiz-Maldonado R., Love A., Francois G. & Palosuo T. 1994. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of Aedes communis and Aedes aegypti mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol,* **104,** 366-71.
Ribeiro J. M. 1987a. Ixodes dammini: salivary anti-complement activity. *Exp Parasitol,* **64,** 347-53.
Ribeiro J. M. 1987b. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu Rev Entomol,* **32,** 463-78.
Ribeiro J. M. 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp Parasitol,* **69,** 104-6.
Ribeiro J. M. 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis,* **4,** 143-52.
Ribeiro J. M., Arca B., Lombardo F., Calvo E., Phan V. M., Chandra P. K. & Wikel S. K. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti. *BMC Genomics,* **8,** 6.
Ribeiro J. M., Endris T. M. & Endris R. 1991. Saliva of the soft tick, Ornithodoros moubata, contains anti-platelet and apyrase activities. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol,* **100,** 109-12.
Ribeiro J. M., Evans P. M., MacSwain J. L. & Sauer J. 1992. Amblyomma americanum: characterization of salivary prostaglandins E2 and F2 alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp Parasitol,* **74,** 112-6.
Ribeiro J. M. & Francischetti I. M. 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol,* **48,** 73-88.
Ribeiro J. M., Hazzard J. M., Nussenzveig R. H., Champagne D. E. & Walker F. A. 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science,* **260,** 539-41.
Ribeiro J. M., Katz O., Pannell L. K., Waitumbi J. & Warburg A. 1999. Salivary glands of the sand fly Phlebotomus papatasi contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J Exp Biol,* **202,** 1551-9.
Ribeiro J. M., Makoul G. T., Levine J., Robinson D. R. & Spielman A. 1985a. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini. *J Exp Med,* **161,** 332-44.
Ribeiro J. M., Mather T. N., Piesman J. & Spielman A. 1987. Dissemination and salivary delivery of Lyme disease spirochetes in vector ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol,* **24,** 201-5.
Ribeiro J. M. & Nussenzveig R. H. 1993. The salivary catechol oxidase/peroxidase activities of the mosquito Anopheles albimanus. *J Exp Biol,* **179,** 273-87.
Ribeiro J. M., Nussenzveig R. H. & Tortorella G. 1994. Salivary vasodilators of Aedes triseriatus and Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol,* **31,** 747-53.
Ribeiro J. M., Rossignol P. A. & Spielman A. 1984a. Role of mosquito saliva in blood vessel location. *J Exp Biol,* **108,** 1-7.

Ribeiro J. M., Rossignol P. A. & Spielman A. 1985b. Salivary gland apyrase determines probing time in anopheline mosquitoes. *Journal of Insect Physiology,* **31,** 689-692.

Ribeiro J. M., Sarkis J. J., Rossignol P. A. & Spielman A. 1984b. Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. *Comp Biochem Physiol B,* **79,** 81-6.

Ribeiro J. M., Schneider M. & Guimaraes J. A. 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug Rhodnius prolixus. *Biochem J,* **308 (Pt 1),** 243-9.

Ribeiro J. M. & Walker F. A. 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of Rhodnius prolixus. *J Exp Med,* **180,** 2251-7.

Ribeiro J. M., Weis J. J. & Telford S. R., 3rd 1990. Saliva of the tick Ixodes dammini inhibits neutrophil function. *Exp Parasitol,* **70,** 382-8.

Rickman L. S., Jones T. R., Long G. W., Paparello S., Schneider I., Paul C. F., Beaudoin R. L. & Hoffman S. L. 1990. Plasmodium falciparum-infected Anopheles stephensi inconsistently transmit malaria to humans. *Am J Trop Med Hyg,* **43,** 441-5.

Ringwald P., Dubois B., Le Bras J. & Deloron P. 1993. Plasmodium falciparum: in vitro models of cytoadherence of infected erythrocytes and an analysis with eight different isolates on different target cells. *Exp Parasitol,* **76,** 442-6.

Robert V., Awono-Ambene H. P. & Thioulouse J. 1998a. Ecology of larval mosquitoes, with special reference to Anopheles arabiensis (Diptera: Culcidae) in market-garden wells in urban Dakar, Senegal. *J Med Entomol,* **35,** 948-55.

Robert V. & Boudin C. 2002. Biologie de la transmission home-moustique du Plasmodium. *Parasitologie,* ***manuscrit n° 2454a***.

Robert V. & Boudin C. 2003. [Biology of man-mosquito Plasmodium transmission]. *Bull Soc Pathol Exot,* **96,** 6-20.

Robert V., Dieng H., Lochouran L., Traore S. F., Trape J. F., Simondon F. & Fontenille D. 1998b. [Malaria transmission in the rural zone of Niakhar, Senegal]. *Trop Med Int Health,* **3,** 667-77.

Robert V., Le Goff G., Toto J. C., Essong J. & Verhave J. P. 1994. Early sporogonic development in local vectors of Plasmodium falciparum in rural Cameroon. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* **89 Suppl 2,** 23-6.

Robert V., Macintyre K., Keating J., Trape J. F., Duchemin J. B., Warren M. & Beier J. C. 2003. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. *Am J Trop Med Hyg,* **68,** 169-76.

Rocha A. C., Braga E. M., Araujo M. S., Franklin B. S. & Pimenta P. F. 2004. Effect of the Aedes fluviatilis saliva on the development of Plasmodium gallinaceum infection in Gallus (gallus) domesticus. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* **99,** 709-15.

Rodhain F. & Perez C. 1985. Précis d'entomologie médicale et vétérinaire.

Rogers K. A. & Titus R. G. 2003. Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. *Parasite Immunol,* **25,** 127-34.

Rogier C. 2003. [Childhood malaria in endemic areas: epidemiology, acquired immunity and control strategies]. *Med Trop (Mars),* **63,** 449-64.

Rogier C., Henry M. C., Rowland M., Carnevale P., Chandre F., Corbel V., Curtis C. & Hougard J. M. 2009a. [Guidelines for phase III evaluation of vector control methods against malaria]. *Med Trop (Mars),* **69,** 173-84.

Rogier C., Henry M. C. & Trape J. F. 2009b. [Epidemiologic evaluation of malaria in endemic areas]. *Med Trop (Mars),* **69,** 123-42.

Rohousova I. & Volf P. 2006. Sand fly saliva: effects on host immune response and Leishmania transmission. *Folia Parasitol (Praha),* **53,** 161-71.

Rossignol P. A., Ribeiro J. M. & Spielman A. 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg,* **33,** 17-20.

Rowe J. A., Claessens A., Corrigan R. A. & Arman M. 2009. Adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med,* **11,** e16.

Roy P., Anandan S., Ravikumar G., Koteeswaran A. & Venugopalan A. T. 1997. Use of egg yolk in seromonitoring against Newcastle disease. *Trop Anim Health Prod,* **29,** 245-6.

Rubio-Palis Y. 1992. Influence of moonlight on light trap catches of the malaria vector Anopheles nuneztovari in Venezuela. *J Am Mosq Control Assoc,* **8,** 178-80.

Sacks D. & Kamhawi S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol,* **55,** 453-83.

Saji F., Samejima Y., Kamiura S. & Koyama M. 1999. Dynamics of immunoglobulins at the feto-maternal interface. *Rev Reprod,* **4,** 81-9.

Sandeman R. 1996. Immune responses to mosquitoes and flies. *The immunology of host-ectoparasitic arthropod relationships, In S. K. Wikel Edition, CAB international, Wallingford.***,** 175-203.

Santos A., Ribeiro J. M., Lehane M. J., Gontijo N. F., Veloso A. B., Sant'Anna M. R., Nascimento Araujo R., Grisard E. C. & Pereira M. H. 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug Triatoma brasiliensis (Hemiptera, Triatominae). *Insect Biochem Mol Biol,* **37,** 702-12.

Sarr J. B., Remoue F., Samb B., Dia I., Guindo S., Sow C., Maiga S., Tine S., Thiam C., Schacht A. M., Simondon F., Konate L. & Riveau G. 2007. Evaluation of antibody response to Plasmodium falciparum in children according to exposure of Anopheles gambiae s.l or Anopheles funestus vectors. *Malar J,* **6,** 117.

Sauer J. R., McSwain J. L., Bowman A. S. & Essenberg R. C. 1995. Tick salivary gland physiology. *Annu Rev Entomol,* **40,** 245-67.

Schneider B. S. & Higgs S. 2008. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **102,** 400-8.

Schneider B. S., McGee C. E., Jordan J. M., Stevenson H. L., Soong L. & Higgs S. 2007. Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection. *PLoS One,* **2,** e1171.

Schneider B. S., Soong L., Girard Y. A., Campbell G., Mason P. & Higgs S. 2006. Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. *Viral Immunol,* **19,** 74-82.

Schneider B. S., Soong L., Zeidner N. S. & Higgs S. 2004. Aedes aegypti salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunol,* **17,** 565-73.

Schoeler G. B., Manweiler S. A. & Wikel S. K. 1999. Ixodes scapularis: effects of repeated infestations with pathogen-free nymphs on macrophage and T lymphocyte cytokine responses of BALB/c and C3H/HeN mice. *Exp Parasitol,* **92,** 239-48.

Schoeler G. B. & Wikel S. K. 2001. Modulation of host immunity by haematophagous arthropods. *Ann Trop Med Parasitol,* **95,** 755-71.

Schofield L. & Hackett F. 1993. Signal transduction in host cells by a glycosylphosphatidylinositol toxin of malaria parasites. *J Exp Med,* **177,** 145-53.

Schwartz B. S., Ford D. P., Childs J. E., Rothman N. & Thomas R. J. 1991. Anti-tick saliva antibody: a biologic marker of tick exposure that is a risk factor for Lyme disease seropositivity. *Am J Epidemiol,* **134,** 86-95.

Schwartz B. S., Goldstein M. D. & Childs J. E. 1993. Antibodies to Borrelia burgdorferi and tick salivary gland proteins in New Jersey outdoor workers. *Am J Public Health,* **83,** 1746-8.

Schwartz B. S., Ribeiro J. M. & Goldstein M. D. 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol,* **132,** 58-66.

Schwarz A., Helling S., Collin N., Teixeira C. R., Medrano-Mercado N., Hume J. C., Assumpcao T. C., Marcus K., Stephan C., Meyer H. E., Ribeiro J. M., Billingsley P. F., Valenzuela J. G., Sternberg J. M. & Schaub G. A. 2009. Immunogenic salivary proteins of Triatoma infestans: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Negl Trop Dis,* **3,** e532.

Shaukat A. M., Breman J. G. & McKenzie F. E. 2010. Using the entomological inoculation rate to assess the impact of vector control on malaria parasite transmission and elimination. *Malar J,* **9,** 122.

Shaw M. K., Tilney L. G. & McKeever D. J. 1993. Tick salivary gland extract and interleukin-2 stimulation enhance susceptibility of lymphocytes to infection by Theileria parva sporozoites. *Infect Immun,* **61,** 1486-95.

Sherman I. W., Eda S. & Winograd E. 2003. Cytoadherence and sequestration in Plasmodium falciparum: defining the ties that bind. *Microbes Infect,* **5,** 897-909.

Smith D. L., Dushoff J., Snow R. W. & Hay S. I. 2005. The entomological inoculation rate and Plasmodium falciparum infection in African children. *Nature,* **438,** 492-5.

Smith D. L., Hay S. I., Noor A. M. & Snow R. W. 2009. Predicting changing malaria risk after expanded insecticide-treated net coverage in Africa. *Trends Parasitol,* **25,** 511-6.

Smith K. A. 1992. Interleukin-2. *Curr Opin Immunol,* **4,** 271-6.

Smith T., Beck H. P., Kitua A., Mwankusye S., Felger I., Fraser-Hurt N., Irion A., Alonso P., Teuscher T. & Tanner M. 1999. Age dependence of the multiplicity of Plasmodium falciparum infections and of other malariological indices in an area of high endemicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg,* **93 Suppl 1,** 15-20.

Smith T., Killeen G., Lengeler C. & Tanner M. 2004. Relationships between the outcome of Plasmodium falciparum infection and the intensity of transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg,* **71,** 80-6.

Smith T. A., Leuenberger R. & Lengeler C. 2001. Child mortality and malaria transmission intensity in Africa. *Trends Parasitol,* **17,** 145-9.

Snounou G., Gruner A. C., Muller-Graf C. D., Mazier D. & Renia L. 2005. The Plasmodium sporozoite survives

RTS,S vaccination. *Trends Parasitol,* **21,** 456-61.
Snow R. W. 1987. Bed-nets and protection against malaria. *Lancet,* **1,** 1493-4.
Snow R. W., Guerra C. A., Noor A. M., Myint H. Y. & Hay S. I. 2005. The global distribution of clinical episodes of Plasmodium falciparum malaria. *Nature,* **434,** 214-7.
Soares M. B., Titus R. G., Shoemaker C. B., David J. R. & Bozza M. 1998. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. *J Immunol,* **160,** 1811-6.
Solbach W. & Laskay T. 2000. The host response to Leishmania infection. *Adv Immunol,* **74,** 275-317.
Souza A. P., Andrade B. B., Aquino D., Entringer P., Miranda J. C., Alcantara R., Ruiz D., Soto M., Teixeira C. R., Valenzuela J. G., de Oliveira C. I., Brodskyn C. I., Barral-Netto M. & Barral A. 2010. Using recombinant proteins from Lutzomyia longipalpis saliva to estimate human vector exposure in visceral Leishmaniasis endemic areas. *PLoS Negl Trop Dis,* **4,** e649.
Spielman A., Wilson M. L., Levine J. F. & Piesman J. 1985. Ecology of Ixodes dammini-borne human babesiosis and Lyme disease. *Annu Rev Entomol,* **30,** 439-60.
Stark K. R. & James A. A. 1998. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. *J Biol Chem,* **273,** 20802-9.
Struik S. S. & Riley E. M. 2004. Does malaria suffer from lack of memory? *Immunol Rev,* **201,** 268-90.
Takken W. 2002. Do insecticide-treated bednets have an effect on malaria vectors? *Trop Med Int Health,* **7,** 1022-30.
Takken W. & Knols B. G. 1999. Odor-mediated behavior of Afrotropical malaria mosquitoes. *Annu Rev Entomol,* **44,** 131-57.
Takken W. & Knols B. G. 2009. Malaria vector control: current and future strategies. *Trends Parasitol,* **25,** 101-4.
Taylor R. R., Egan A., McGuinness D., Jepson A., Adair R., Drakely C. & Riley E. 1996. Selective recognition of malaria antigens by human serum antibodies is not genetically determined but demonstrates some features of clonal imprinting. *Int Immunol,* **8,** 905-15.
Taylor T. E., Fu W. J., Carr R. A., Whitten R. O., Mueller J. S., Fosiko N. G., Lewallen S., Liomba N. G. & Molyneux M. E. 2004. Differentiating the pathologies of cerebral malaria by postmortem parasite counts. *Nat Med,* **10,** 143-5.
Teixeira C., Gomes R., Collin N., Reynoso D., Jochim R., Oliveira F., Seitz A., Elnaiem D. E., Caldas A., de Souza A. P., Brodskyn C. I., de Oliveira C. I., Mendonca I., Costa C. H., Volf P., Barral A*., et al.* 2010. Discovery of markers of exposure specific to bites of Lutzomyia longipalpis, the vector of Leishmania infantum chagasi in Latin America. *PLoS Negl Trop Dis,* **4,** e638.
Telford S. R., 3rd, Armstrong P. M., Katavolos P., Foppa I., Garcia A. S., Wilson M. L. & Spielman A. 1997. A new tick-borne encephalitis-like virus infecting New England deer ticks, Ixodes dammini. *Emerg Infect Dis,* **3,** 165-70.
Theodos C. M., Povinelli L., Molina R., Sherry B. & Titus R. G. 1991a. Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect Immun,* **59,** 2839-42.
Theodos C. M., Ribeiro J. M. & Titus R. G. 1991b. Analysis of enhancing effect of sand fly saliva on Leishmania infection in mice. *Infect Immun,* **59,** 1592-8.
Theze J., Alzari P. M. & Bertoglio J. 1996. Interleukin 2 and its receptors: recent advances and new immunological functions. *Immunol Today,* **17,** 481-6.
Titus R. G., Bishop J. V. & Mejia J. S. 2006. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. *Parasite Immunol,* **28,** 131-41.
Titus R. G. & Ribeiro J. M. 1988. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. *Science,* **239,** 1306-8.
Titus R. G., Theodos C. M., Shankar A. H. & Hall L. R. 1994. Interactions between Leishmania major and macrophages. *Immunol Ser,* **60,** 437-59.
Tongren J. E., Zavala F., Roos D. S. & Riley E. M. 2004. Malaria vaccines: if at first you don't succeed. *Trends Parasitol,* **20,** 604-10.
Touray M. G., Seeley D. C., Jr. & Miller L. H. 1994. Plasmodium gallinaceum: differential lysis of two developmental stages of malaria sporozoites by the alternative pathway of complement. *Exp Parasitol,* **78,** 294-301.
Trape J. F. 2000. Les limites des moustiquaires impréniées dans la lutte contre le paludisme en Afrique tropicale. Journée " Situation et persepectives en prophylaxie antipaludique". *IMTSSA*.
Trape J. F., Lefebvre-Zante E., Legros F., Ndiaye G., Bouganali H., Druilhe P. & Salem G. 1992. Vector density

gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. *Am J Trop Med Hyg,* **47,** 181-9.
Trimnell A. R., Davies G. M., Lissina O., Hails R. S. & Nuttall P. A. 2005. A cross-reactive tick cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine,* **23,** 4329-41.
Trimnell A. R., Hails R. S. & Nuttall P. A. 2002. Dual action ectoparasite vaccine targeting 'exposed' and 'concealed' antigens. *Vaccine,* **20,** 3560-8.
Urioste S., Hall L. R., Telford S. R., 3rd & Titus R. G. 1994. Saliva of the Lyme disease vector, Ixodes dammini, blocks cell activation by a nonprostaglandin E2-dependent mechanism. *J Exp Med,* **180,** 1077-85.
Valenzuela J. G., Belkaid Y., Rowton E. & Ribeiro J. M. 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly Phlebotomus papatasi belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J Exp Biol,* **204,** 229-37.
Valenzuela J. G., Charlab R., Galperin M. Y. & Ribeiro J. M. 1998. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug Cimex lectularius. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J Biol Chem,* **273,** 30583-90.
Valenzuela J. G., Charlab R., Gonzalez E. C., de Miranda-Santos I. K., Marinotti O., Francischetti I. M. & Ribeiro J. M. 2002a. The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Mol Biol,* **11,** 149-55.
Valenzuela J. G., Pham V. M., Garfield M. K., Francischetti I. M. & Ribeiro J. M. 2002b. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito Aedes aegypti. *Insect Biochem Mol Biol,* **32,** 1101-22.
Vallely A., Vallely L., Changalucha J., Greenwood B. & Chandramohan D. 2007. Intermittent preventive treatment for malaria in pregnancy in Africa: what's new, what's needed? *Malar J,* **6,** 16.
Van Den Abbeele J., Caljon G., Dierick J. F., Moens L., De Ridder K. & Coosemans M. 2007. The Glossina morsitans tsetse fly saliva: general characteristics and identification of novel salivary proteins. *Insect Biochem Mol Biol,* **37,** 1075-85.
Waitayakul A., Somsri S., Sattabongkot J., Looareesuwan S., Cui L. & Udomsangpetch R. 2006. Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand. *Acta Trop,* **98,** 66-73.
Waitumbi J. & Warburg A. 1998. Phlebotomus papatasi saliva inhibits protein phosphatase activity and nitric oxide production by murine macrophages. *Infect Immun,* **66,** 1534-7.
Wanasen N., Nussenzveig R. H., Champagne D. E., Soong L. & Higgs S. 2004. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. *Med Vet Entomol,* **18,** 191-9.
Warburg A., Saraiva E., Lanzaro G. C., Titus R. G. & Neva F. 1994. Saliva of Lutzomyia longipalpis sibling species differs in its composition and capacity to enhance leishmaniasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **345,** 223-30.
Wasinpiyamongkol L., Patramool S., Luplertlop N., Surasombatpattana P., Doucoure S., Mouchet F., Seveno M., Remoue F., Demettre E., Brizard J. P., Jouin P., Biron D. G., Thomas F. & Misse D. 2010. Blood-feeding and immunogenic Aedes aegypti saliva proteins. *Proteomics,* **10,** 1906-16.
Weichsel A., Andersen J. F., Champagne D. E., Walker F. A. & Montfort W. R. 1998. Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat Struct Biol,* **5,** 304-9.
Weill M., Chandre F., Brengues C., Manguin S., Akogbeto M., Pasteur N., Guillet P. & Raymond M. 2000. The kdr mutation occurs in the Mopti form of Anopheles gambiae s.s. through introgression. *Insect Mol Biol,* **9,** 451-5.
Wekesa J. W., Copeland R. S. & Mwangi R. W. 1992. Effect of Plasmodium falciparum on blood feeding behavior of naturally infected Anopheles mosquitoes in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg,* **47,** 484-8.
White N. J. 2004. Sharing malarias. *Lancet,* **363,** 1006.
White N. J. & Ho M. 1992. The pathophysiology of malaria. *Adv Parasitol,* **31,** 83-173.
WHO-Unicef 2003. Rapport sur le paludisme en Afrique. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 1996. Weekly epidemiological record. 17-22. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2000. Drug resistance of malaria parasites. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2005. The world malaria report 2005. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2006a. Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs). *In: World_Health_Organization (ed.) WHO/CDS/NTD/WHOPES/ GCDDP/2006.3*.
WHO 2006b. Guidelines for the Treatment of malaria. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2006c. Weekly epidemiological record 69-80. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2008. World Malaria Report 2008. Available in: http://www.who.int/publications/en/
WHO 2009. World Malaria Report 2009. Available in: http://www.who.int/publications/en/
Wikel S. K. 1979. Acquired resistance to ticks: expression of resistance by C4-deficient guinea pigs. *Am J Trop Med Hyg,* **28,** 586-90.

Wikel S. K. 1982. Immune responses to arthropods and their products. *Annu Rev Entomol,* **27,** 21-48.
Wikel S. K. 1996. Tick modulation of host cytokines. *Exp Parasitol,* **84,** 304-9.
Wikel S. K., Ramachandra R. N., Bergman D. K., Burkot T. R. & Piesman J. 1997. Infestation with pathogen-free nymphs of the tick Ixodes scapularis induces host resistance to transmission of Borrelia burgdorferi by ticks. *Infect Immun,* **65,** 335-8.
Wipasa J., Suphavilai C., Okell L. C., Cook J., Corran P. H., Thaikla K., Liewsaree W., Riley E. M. & Hafalla J. C. 2010. Long-lived antibody and B Cell memory responses to the human malaria parasites, Plasmodium falciparum and Plasmodium vivax. *PLoS Pathog,* **6,** e1000770.
Wongsrichanalai C., Barcus M. J., Muth S., Sutamihardja A. & Wernsdorfer W. H. 2007. A review of malaria diagnostic tools: microscopy and rapid diagnostic test (RDT). *Am J Trop Med Hyg,* **77,** 119-27.
Woods K., Hamilton C. J. & Field R. A. 2004. Enzymatic liberation of lycotetraose from the Solanum glycoalkaloid alpha-tomatine. *Carbohydr Res,* **339,** 2325-8.
Worrall E., Basu S. & Hanson K. 2005. Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Trop Med Int Health,* **10,** 1047-59.
Zeidner N., Mbow M. L., Dolan M., Massung R., Baca E. & Piesman J. 1997. Effects of Ixodes scapularis and Borrelia burgdorferi on modulation of the host immune response: induction of a TH2 cytokine response in Lyme disease-susceptible (C3H/HeJ) mice but not in disease-resistant (BALB/c) mice. *Infect Immun,* **65,** 3100-6.
Zeidner N. S., Higgs S., Happ C. M., Beaty B. J. & Miller B. R. 1999. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunol,* **21,** 35-44.
Zeidner N. S., Schneider B. S., Nuncio M. S., Gern L. & Piesman J. 2002. Coinoculation of Borrelia spp. with tick salivary gland lysate enhances spirochete load in mice and is tick species-specific. *J Parasitol,* **88,** 1276-8.
Zer R., Yaroslavski I., Rosen L. & Warburg A. 2001. Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. *Int J Parasitol,* **31,** 810-4.
Zhang Y., Ribeiro J. M., Guimaraes J. A. & Walsh P. N. 1998. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. *Biochemistry,* **37,** 10681-90.

PUBLICATIONS

PATENT

Remoue F., Poinsignon A., Cornelie S., **Drame P.M**., Doucoure S, Mouchet F, Rossignol M et Corbel V. Méthodes pour évaluer l'efficacité de stratégie de lutte anti-vectorielle dans le contrôle du paludisme et des arboviroses. **January 2010**. ***Patent n° FR10/00172.***

Drame PM, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J,, Sow C, Dos-Santos MA, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. **2010**. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy of Insecticides Treated Nets in Malaria Vector Control. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 83 (1): 115-121.

Poinsignon A, Samb B, Doucoure S, **Drame PM**, Sarr JB, Sow C, Cornelie S, Maiga S, Thiam C, Rogerie F, Guindo S, Hermann E, Simondon F, Dia I, Riveau G, Konate L and Remoue F. **2010**. A First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an imuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *An. funestus* bites. *Trop Med Int Health.*;15(10): 1198-203..

Drame PM, Poinsignon A., Besnard P, Le Mire J, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembène M, Boulanger D, Simondon, F Fortes F, Carnevale P, and Remoue F. **2010**. Human antibody (Ab) response to a peptide of *Anopheles* specific gSG6 salivary protein: a new epidemiological indicator evaluating the efficacy of Insecticides Treated Nets (ITNs). *PlosOne* 5 (12): e 15596

Drame P.M., Machault V., Diallo A., Poinsignon A., Ndecky A., Cornelie S., Doucoure S., Dos-Santos S., Lalou R., Sembene M., Hesran J-Y., Pages F. and Remoue F**.** Human IgG response to gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool evaluating the exposure heterogeneity to *Anopheles* bites in urban context of malaria. *Submitted.*

Drame PM, Poinsignon A, Dechavanne C, Cotterel G, Farce M, Courtin D., Fievet N, Assougbodji A, Miguot-Nabias F, Garcia A and Remoue F. First-years life acquisition of human IgG response specific to salivary gSG6-P1 peptide, a immuno-epidemiological tool for evaluating exposure to *Anopheles* bites. *In process*

Drame P.M., Diallo A., Poinsignon A., Cornelie S., Ndoncky A., Doucoure S., Dos-Santos S., Lalou R., Sembene M., Hesran J-Y., and Remoue F**.** gSG6-P1 *Anopheles* salivary peptide to evaluate the population own-use of vector control tools in urban settings in Dakar, Senegal. *In process.*

ORAL COMMUNICATIONS

Remoue F., Cornelie S., Poinsignon A., **Drame P.M**., Doucoure S., Sow C., N'Diaye A, N'Gom M., Senglat M., Boulanger D. et Simondon F. Immuno-epidemiologiy of human-vector relationship during malaria: towards the identification of marker of exposure to *Anopheles* bites? 17th Conference of the African Association of Insect Scientists - 2007 (11-15 June). Dakar, Senegal.

Poinsignon A, Cornelie S., **Drame P.M**., Arca, Simondon F et Remoue F. gSG6, une protéine salivaire spécifique *d'Anopheles gambiae*, candidate pour l'élaboration d'un marqueur d'exposition à la piqûre du vecteur du paludisme? 17th Conference of the African Association of Insect Scientists - 2007 (11-15th June). Dakar, Senegal.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Foumane V., Sow C., Le Mire J., Fortes F., Boulanger D., Carnevale P., Simondon F. and Remoue F. Réponse anticorps spécifique à des protéines salivaires d'*Anopheles*: un nouvel outil pour évaluer l'efficacité de stratégies anti-vecteur contre le paludisme ? 12ème Journées dakaroises de Parasitologie ; Société Africaine de Parasitologie (SOAP). 30-31 Mai 2008, Dakar, Sénégal.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Foumane V., Sow C., Le Mire J., Fortes F., Boulanger D., Carnevale P., Simondon F. and Remoue F. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: a new immuno-epidemiological marker to evaluate the effectiveness of Insecticides Treated Nets (ITNs)? 57th congress of American Society of Tropical Medicine and Hygine (ASTMH), December 07-11th 2008, New-Orleans, USA.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Toto J-C., Sow C., Le Mire J., Fortes F., Boulanger D., Carnevale P., Simondon F. and Remoue F. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: a new immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy of Insecticides Treated Nets (ITNs)? 2nd Congress of Angolese Medical Doctors, January 26th 2008, Luanda, Angola.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Toto J-C.., Le Mire J., Fortes F., Boulanger D., Carnevale P., and Remoue F. Human antibody response to *Anopheles* specific salivary proteins: a new immuno-epidemiological marker to evaluate the efficacy of Insecticides Treated Nets (ITNs)? 5th congress of Multilateral Initiative for Malaria (MIM), November 02nd to 07th 2009, Nairobi, Kenya.

Drame P.M., Poinsignon A., Besnard P., Cornelie S., Foumane V., Sow C., Le Mire J., Fortes F., Boulanger D., Carnevale P., Simondon F. and Remoue F. Human antibody response to Anopheles salivary gSG6-P1 peptide: new immuno-epidemiological tool for evaluating the efficacy of Insecticide Treated Nets (ITNs) in malaria vector control. 59th congress of American Society of Tropical Medicine and Hygine (ASTMH), November 01-08th 2010, Atlanta, USA.

Am. J. Trop. Med. Hyg., 83(1), 2010, pp. 115–121
doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0684
Copyright © 2010 by The American Society of Tropical Medicine and Hygiene

Human Antibody Response to *Anopheles gambiae* Saliva: An Immuno-Epidemiological Biomarker to Evaluate the Efficacy of Insecticide-Treated Nets in Malaria Vector Control

Papa M. Drame,* Anne Poinsignon, Patrick Besnard, Jacques Le Mire, Maria A. Dos-Santos, Cheikh S. Sow, Sylvie Cornelie, Vincent Foumane, Jean-Claude Toto, Mbacké Sembene, Denis Boulanger, François Simondon, Filomeno Fortes, Pierre Carnevale, and Franck Remoue

Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UR024 "Epidémiologie et Prévention" Unit, Dakar, Senegal; Institut de Recherche pour le Développement, UR016 "Contrôle et Caractérisation des Populations Vecteurs" Unit, Montpellier, France; Malaria Control Program, Société Nationale de Métallurgie (SONAMET), Lobito, Angola; Organisation de Coordination pour la Lutte contre les Endémies en Afrique (OCEAC), Laboratoire de Recherche sur le Paludisme, Yaoundé, Cameroun; Université Cheikh Anta Diop, Département de Biologie Animale, Dakar, Senegal; National Malaria Control Program, Ministry of Health, Luanda, Angola

Abstract. For the fight against malaria, the World Health Organization (WHO) has emphasized the need for indicators to evaluate the efficacy of vector-control strategies. This study investigates a potential immunological marker, based on human antibody responses to *Anopheles* saliva, as a new indicator to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets (ITNs). Parasitological, entomological, and immunological assessments were carried out in children and adults from a malaria-endemic region of Angola before and after the introduction of ITNs. Immunoglobulin G (IgG) levels to *An. gambiae* saliva were positively associated with the intensity of *An. gambiae* exposure and malaria infection. A significant decrease in the anti-saliva IgG response was observed after the introduction of ITNs, and this was associated with a drop in parasite load. This study represents the first stage in the development of a new indicator to evaluate the efficacy of malaria vector-control strategies, which could apply in other arthropod vector-borne diseases.

INTRODUCTION

Most emerging and reemerging diseases are transmitted by arthropod vectors such as mosquitoes (malaria, dengue, and chikungunya), ticks (Lyme disease), and sandflies (leishmaniasis). Among these vector-borne diseases, malaria represents the greatest worldwide public health problem. The World Health Organization (WHO) estimates that 350–500 million people are infected by malaria annually, which causes 1.1–2.7 million deaths.[1] Most of these deaths occur in children from southern Saharan Africa and are caused by *Plasmodium falciparum*, which causes the most severe form of the disease. In these areas, the *Anopheles gambiae* complex is the major vector.[1]

Today, many preventive methods are available against both parasite (chemoprophylaxis) and vector (insecticide-based control of either larvae or adults) and are in widespread use. It has been well-documented that the use of synthetic insecticides can dramatically reduce the incidence of insect-borne diseases, notably malaria.[1–3] Among such strategies, insecticide-treated nets (ITNs) are currently the most efficient at reducing vector exposure, *Plasmodium* transmission, and malaria morbidity.[4–7] When correctly used, even moderate coverage of adults and children (35–65%) can result in greater community benefit than personal protection.[8–11]

Evaluating ITNs efficacy is currently based on entomological methods (mosquito abundance, blood feeding rates, mortality, etc.) and in humans, parasitological tests.[4,12,13] The reference WHO method for phase 3 trials is measurement of the density of *P. falciparum*.[12] However, these methods have certain limitations when it comes to large-scale field studies, especially where transmission rates and exposure levels are low (dry season, altitude, and urban context). For example, the evaluation of *Plasmodium* density requires a precise and active follow-up of populations in longitudinal studies. Entomological methods are mainly applicable at the population level and do not give a measure of the heterogeneity of individual exposure. Human-landing catch using adult volunteers is currently the best method for evaluating individual human exposure; however, this method raises ethical questions, and the results may not extrapolate to children.[14] In addition, as exposure levels dropped after the introduction of ITNs in endemic areas, these monitoring methods became less effective in National Malaria Control Programs.[15]

To improve vector control in line with the WHO recommendations, much effort is being devoted to developing new indicators and methods to evaluate—at the individual level—the efficacy of ITNs and other malaria vector-control strategies.

One approach is based on the idea that exposure to arthropod vector bites can be assessed by monitoring human–vector contact. It had been previously shown that the human antibody (Ab) response to arthropod salivary proteins could give a measure of exposure to vector bites.[16] At the time of biting, the female mosquito injects saliva containing bioactive molecules, including vasodilators and anticoagulants, that make the blood meal possible.[17,18] Human Ab responses to the saliva of *Triatoma*, vectors of Chagas disease,[19] *Ixodes* ticks, vectors of *Borrelia bugdorferi*,[20] phlebotomies,[21,22] vectors of *Leishmania*, *Glossina*,[23] and vectors of human African trypanosomiasis have been reported as reliable immunological markers for vector exposure. With respect to mosquitoes, anti-saliva Ab responses can give a measure of exposure to *Culex* and *Aedes*[24–27] as well as *An. gambiae*.[28]

This work addresses a potentially important application of this "saliva" biomarker as an immunological tool to evaluate the efficacy of ITN-based strategies. Human immunoglobulin G (IgG) responses to whole *An. gambiae* saliva were evaluated before and after the introduction of ITNs in children and adults living in a malaria-endemic and semi-urban area. The results were compared with the reference data derived using entomological and parasitological methods.

MATERIALS AND METHODS

Study population. This study was conducted in Lobito, a coastal city of western Angola, from March 2005 to October

*Address correspondence to Papa Makhtar Drame, IRD/CREC, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Bénin. E-mail: papa-makhtar.drame@ird.fr

2006. The site is in the tropical savannah with a rainy season from October to May, and the area is typical of the humid tropical and intertropical regions of Africa with approximately 600–700 mm of rain per year. The duration of the malaria transmission season varies between 7 and 12 months with a peak between January and May. The most important malaria vector in this area is the *An. gambiae* s.l. complex.[29,30]

Twenty-one households of workers for the Société Nationale de Métallurgie (SONAMET) company were randomly selected from a malaria register of 2004 of the SONAMET in-patient clinic. These families lived in the same district of Bella Vista under the aegis of the SONAMET Malaria Control Program (MCP). The number of individuals in each household varied from 2 to 23. Two hundred thirty individuals of the twenty-one selected households, including all children and adults, were included for longitudinal follow-up, and evaluations occurred every 6 weeks over two periods: from March 2005 to January 2006 and from April 2006 to October 2006. The families were given ITNs (long-lasting insecticide net; LLIN) treated with deltamethrin (Permanet mosquito nets) in February 2006 (according to the number of rooms and beds per household). At each visit, thick blood smear and dried blood spot (on filter paper) samples were collected from each individual for parasitological measurements and immunological analysis, respectively. Parasite density (parasitaemia) was calculated as the number of *P. falciparum* parasites per microliter of blood; mean parasitaemia values ($x + 1$) were calculated by including positive and negative individual readings. Immunological tests were performed in a subsample of the whole study population ($N = 109$; 76 children aged from 0 to 10 years and 33 individuals aged more than 10 years) for whom blood spots were available for at least 12 of 14 visits; only 21 of 109 individuals missed one ($N = 13$) or two ($N = 8$) visits. Filter papers were kept at 4°C in Silicagel before testing.

The present study was conducted in accordance with the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration and was approved by the ethical authorities (National MCP of the Ministry of Health of Angola, October 17, 2008).

Entomological analysis and survey of ITN use. Mosquitoes were collected every 6 weeks during the studied period at six reference households that were representative of the studied area. *An. gambiae* density was evaluated using capture by light traps (Center for Disease Control and Prevention [CDC] miniature light trap) placed from 19:00 hours to 07:00 hours for two consecutive nights. Polymerase chain reaction (PCR) was used to confirm genus and species to yield an estimate of the number of *An. Gambiae* per trap per night.

After the introduction of ITNs, their use was checked by local staff and through the administration of questionnaires every 6 weeks in all studied households. The questionnaires covered (1) the number of ITNs installed, (2) the number of exchanged ITNs, and (3) the number of damaged ITNs (holes, torn, etc.).

Method of *Anopheles* salivation. A mosquito salivation technique was improved to collect whole salivary extracts (WSE) from uninfected female *An. gambiae* bred in an insectarium (Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Dakar, Senegal), as previously described.[28] Briefly, mosquitoes were sedated with CO_2, and their legs and wings were removed. Their proboscis was placed in 10 L Hepes–NaCl buffer in a conventional plastic tip fixed on a glass slide. Salivation was stimulated by topical application of 0.25% malathion in acetone to the thorax region. After 1 hour of salivation at room temperature, the liquid in the tip (saliva + buffer) was collected and pooled with other mosquito saliva. Despite variability, this technique of salivation yielded 100–400 g/mL of salivary proteins, which corresponded to 20–75 ng/mosquito.[28] The WSE batch was then pooled to obtain only one WSE that had been stored frozen at –20°C before use in immunological tests.

Evaluation of human IgG Ab levels by enzyme-linked immunosorbent assay. The standardized dried blood spots (blood fills one 1-cm circle) were eluted by incubation in 300 l of phosphate buffer (PBS; Tween 0.1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) at 4°C for 24 hours.

A Maxisorp plate (Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 32 L of the pooled WSE batch diluted (1/200) in carbonate/bicarbonate buffer for 2 hours and 30 minutes at 37°C. After washing, each eludate was incubated in duplicate at 4°C overnight at a 1/20 dilution (Tween 0.1%). This optimal dilution was determined after several preliminary experiments. Mouse biotinylated Ab to human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA) was incubated at a 1/1,000 dilution (1 hour and 30 minutes at 37°C), and peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham, Les Ulis, France) was then added (1/1,000; 1 hour at 37°C). Colorimetric development was carried out using 2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium (ABTS; Roche Diagnostics, Lyon, France) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H_2O_2, and absorbance (OD) was measured at 405 nm. In addition, the absence of significant Ab detection was verified in wells without antigen (ODn = background Ab response). Individual results were expressed as the ΔOD value calculated according to the formula ΔOD = ODx – ODn, where ODx represented the mean of individual OD values in antigen wells.

Statistical analysis. All data were analyzed with GraphPad Prism4 software (San Diego, CA). After verifying that values did not assume Gaussian distribution, the non-parametric Mann–Whitney *U* test was used for comparison of Ab levels of two independent groups, the Wilcoxon matched-pairs test was used for comparison of two paired groups, the non-parametric Kruskal–Wallis test was used for comparison of more than two groups, and the χ^2 test was used for comparison of two proportions. All differences were considered significant at $P < 0.05$.

RESULTS

Entomological and parasitological data. The level of exposure to *An. gambiae* s.l. is expressed by the mean number of *An. gambiae* per trap per night at each passage (Figure 1). Before the introduction of ITNs (March 2005 to January 2006), the intensity of exposure was low and varied by season with a peak during the rainy season (April to May). After the introduction of ITNs in 2006, a similar seasonal change was observed (not significant between May 2005 and April/May 2006). These results suggest that exposure levels to *An. gambiae* were similar before and after the introduction of ITNs.

Prevalence and intensity of *P. falciparum* infection in the total population ($N = 230$) and the immunological subpopulation ($N = 109$) (Figure 2) show no significant difference, indicating that the subpopulation seems to be representative of the total population. In 2005, prevalence peaked in May

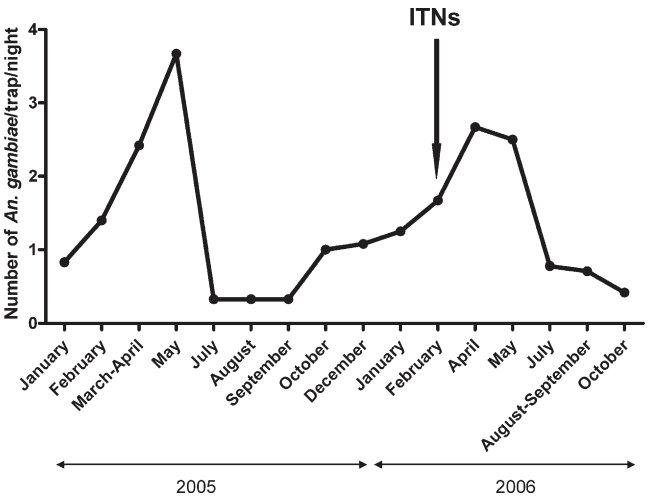


FIGURE 1. Evolution of *An. gambiae* exposure according to the studied period. Exposure to *An. gambiae* s.s. is presented as the mean of number of *An. gambiae* collected by trap and by night in six controlled households for each visit in 2005 and 2006. The arrow indicates the installation of ITNs in February 2006.

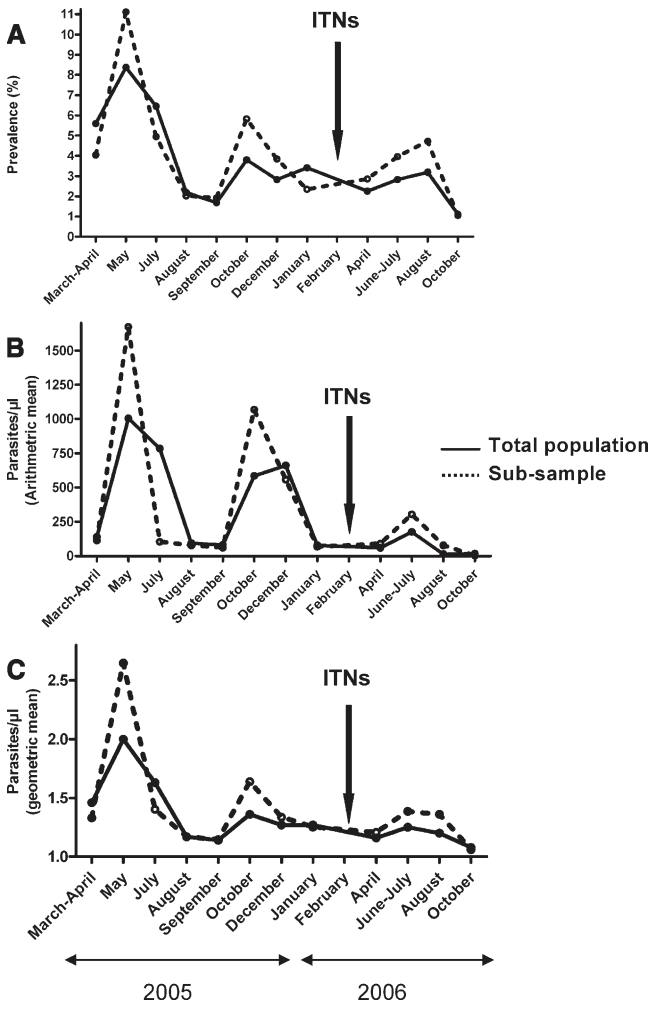


FIGURE 2. Prevalence and intensity of *P. falciparum* infection before and after the introduction of ITNs. The prevalence (**A**), arithmetic (**B**), and geometric (**C**) mean of infection intensity (parasitaemia) are presented in the whole population (N = 230; solid line) and the "immunological" subsample (N = 109; dotted line), which is described in *Materials and Methods*. The arrow indicates the installation of ITNs in February 2006.

and remained low throughout the study period. After the introduction of ITNs in February 2006, no significant peak was observed, and a reduction of 40% (subpopulation) was observed in April 2006 compared with May 2005 (Figure 2A). In terms of parasitaemia, the arithmetic (Figure 2B) and geometric (Figure 2C) means profoundly decreased in 2006 compared with 2005. In particular, the highest intensity, which was observed in May 2005, disappeared after the introduction of ITNs in 2006, although the difference was not significant (P = 0.33 between March/April 2005 and April 2006; P = 0.07 between May 2005 and April 2006). Taken together, these results suggest that the use of ITNs in this area effectively decreased malaria transmission, although the prevalence of *P. falciparum* was very low.

Results of ITN surveys. After the installation of ITNs (N = 230 for whole studied population) in February 2006, the loss rate and the correct-usage rate (damaged or not) were evaluated by means of two horizontal surveys (Table 1), one at the peak of the exposure season (April = survey 1) and the other at the beginning of the dry season (June/July = survey 2).

After just 2 months of use (survey 1), the rate of ITN loss was 21.5%, and this had increased to 26.9% after 4 months (survey 2; P = 0.3). The observed rate of use was 98.0% in April 2006, but it significantly decreased to 86.3% in June/July 2006 (P = 0.004). This loss of installed ITNs was accompanied by a significant increase in the use of damaged ITNs from 7% (survey 1) to 15.9% (survey 2; $P < 0.05$). Taken together, these results indicate that after just 4 months of installation (June/July), only 63% (82/130) of the ITNs were installed, and only 53% (69/130) were being used correctly (in use and undamaged).

Evaluation of anti-saliva IgG response before and after ITNs use. Changes in anti-saliva IgG Ab levels (median) and parasitaemia (geometric mean) are presented for the subpopulation (Figure 3). Specific IgG levels showed considerable seasonal variations before the introduction of ITNs in 2005 ($P < 0.0001$). The first peak was observed during the rainy season (May) and was associated with the peak of intensity of *P. falciparum* infection. After a decrease from July to September, a second anti-saliva IgG response peak was observed in October.

As observed for parasitaemia, the level of anti-saliva IgG Ab was considerably lower in 2006 than in 2005, regardless of month. In particular, a very low specific IgG level was observed from April to August 2006. Interestingly, the peak of specific IgG response in April/May 2005 disappeared in April 2006 ($P < 0.0001$), which was shortly after the introduction of ITNs (after 2–4 months of use). This effect was accompanied by a decrease in *P. falciparum* parasitaemia. In October 2006, anti-saliva IgG responses increased over the previous months, which was also observed in 2005; however, the Ab level remained significantly lower than in 2005 ($P < 0.001$).

The trend in anti-saliva IgG responses over the study period was also analyzed according to age (three age groups: 0–6 years [N = 49], 7–14 years [N = 34], and > 14 years [N = 25]). Changes in Ab levels in 2005–2006 were similar in all age groups (data not shown), suggesting that age did not affect specific Ab responses. In addition, it suggested that the considerable decrease in anti-

TABLE 1
Survey of ITNs use

Variable	Survey 1 (April 10–22, 2006)	Survey 2 (June 26–July 12, 2006)	*P*
	Loss rate		
Duration of ITN use (months)	2	4	
ITNs found	102	95	
ITNs lost	28	35	
Rate of loss	21.5%	26.9%	0.3
	Correct-use rate		
ITNs installed (%)	100/102 (98.0%)	82/95 (86.3%)	0.004
ITNs not damaged	93/100 (93.0%)	69/82 (84.1%)	< 0.05
ITNs exchanged	(0.0%)	(0.0%)	

Two sectional surveys evaluating ITNs use were performed in April (peak of the season of exposure to *An. gambiae*—survey 1) and June to July (beginning of dry season—survey 2), just after the installation of ITNs ($N = 130$) in February 2006. The "loss rate" and "correct-use rate" are indicated for each survey, and the *P* value indicates the significant percentage differences between surveys 1 and 2 (χ^2 test).

saliva IgG levels observed after the introduction of ITNs in 2006 was similar at all ages (young children, children, and adults).

Individual anti-saliva IgG response before and after ITNs use. Individual anti-saliva IgG Ab levels were compared before and after the introduction of ITNs; data is only presented for corresponding months in 2005 and 2006 (April/May, July, August, and October) (Figure 4). In April 2006, data were acquired April 10–22, whereas in 2005, they were acquired at the beginning of April (March 26 to April 12) and in mid-May (May 15 to June 4). For this reason, the IgG Ab level in April 2006 has to be compared with both April and May 2005.

In spite of intraindividual variations, a major drop in anti-saliva IgG responses was observed after the introduction of ITNs in all individuals. IgG levels were lower in 2006 than in 2005 for July ($P < 0.01$; Wilcoxon matched-pairs test), August ($P < 0.001$), and October ($P < 0.001$). More interestingly, individual specific Ab levels were very low in April 2006. Major decreases in anti-saliva IgG responses were, therefore, observed in all individuals within 2 months of ITN introduction ($P < 0.001$ for April 2006 compared with March/April 2005; $P < 0.0001$ for April 2006 compared with May 2005; Wilcoxon matched-pairs test).

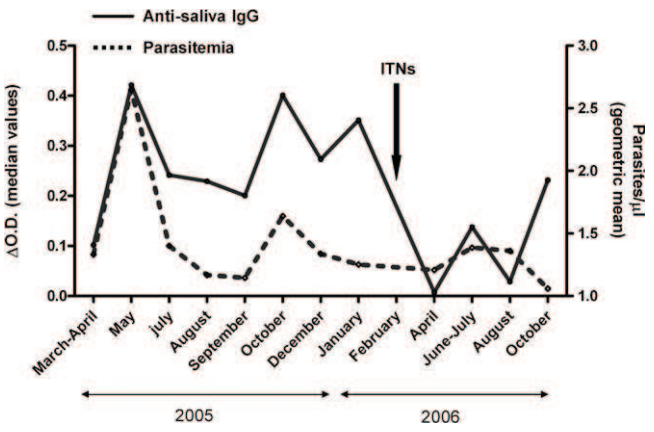


FIGURE 3. IgG antibody response to *An. gambiae* saliva before and after ITNs use. The median anti-saliva IgG level (solid line) and the intensity of parasite infection (the geometric mean of parasite densities is represented by the dotted line) are presented in the "immunological" subsample ($N = 109$) before (2005) and after (2006) the installation of ITNs. The arrow indicates the installation of ITNs in February 2006.

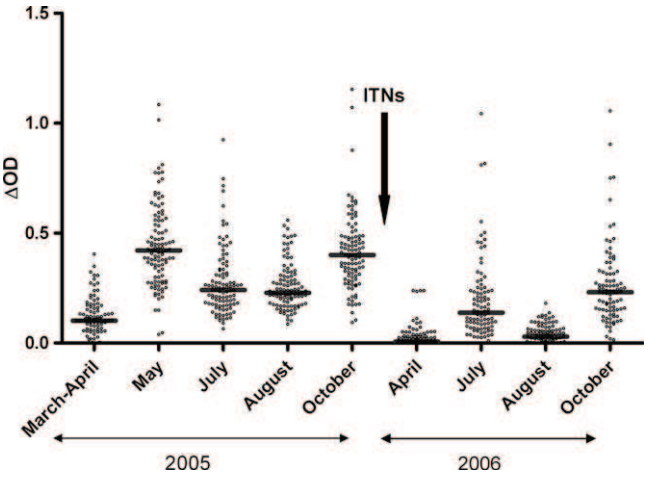


FIGURE 4. Individual IgG antibody levels to *An. gambiae* saliva according the season and the use of ITNs. Individual anti-saliva IgG levels for the "immunological" subpopulation ($N = 109$) before (2005) and after (2006) the installation of ITNs. The arrow indicates the installation of ITNs in February 2006. Bars indicate the median value for each studied month.

DISCUSSION

In this study, the human Ab response to *An. gambiae* whole saliva was investigated over 2 years in adults and children before and after the introduction of ITNs.

Before ITNs (2005), anti-saliva IgG responses varied seasonally. A major peak was observed in May after the rainy period (March to April), and it was associated with the peaks of (1) intensity of exposure to *An. gambiae* bites, as evaluated by entomological methods, and (2) parasite density. These results point to an association between the entomo-parasitological data and anti-saliva IgG Ab levels, confirming the validity of this anti-vector Ab parameter as an immuno-epidemiological marker for *An. gambiae* exposure and the risks of malaria transmission. It confirms previous results observed in Thailand with *An. stephensi* and *P. falciparum* and *P. vivax* complexes[31] and results seen in rural Senegal for *An. gambiae* exposure in children.[28] These results in Angola, covering both children and adults, suggest that this immunological marker could also be used to evaluate *Anopheles* exposure in adults.

The correct use of deltamethrin ITNs (from February 2006) was followed by a considerable decrease of *P. falciparum* prevalence and parasitaemia (the WHO reference criteria for evaluating ITN efficacy), indicating that ITN use was effective. In the area studied, the decrease in prevalence/intensity of malaria was not significant after the introduction of ITNs, although there seemed to be a real decrease between 2005 and 2006; the difference was not significant, probably because of the very low prevalence of malaria coupled with the smallness of the sample. For the purposes of evaluating the efficacy of ITNs, these results strengthen the special interest to evaluate the Ab response to *Anopheles* saliva (1) in a context of low malaria transmission and (2) in a subpopulation (around $N = 100$) compared with analysis with parasitemia referent criteria that needs a large population (around $N = 1{,}000$).

The ITNs surveys indicated that only 53% of ITNs were being correctly used and were undamaged after just 4 months of use (June/July); this result has been reported in several other endemic areas.[32] In concordance with these results, we

have shown that the anti-saliva IgG Ab level decreased considerably after the use of ITNs (2006) compared with 2005. This decrease was observed at both the population level and the individual level and was particularly marked in April 2006 compared with April/May 2005, corresponding to the peak of exposure/transmission. Surprisingly, a small increase in specific IgG levels was observed in October 2006, which had been observed before the introduction of ITNs in 2005. This could be caused by the incorrect use, which is suggested by the results of the ITN surveys. Taken together, the results showed that the evaluation of anti-saliva IgG Ab levels could be used to evaluate the efficacy of ITNs in such malaria hypo-endemic transmission areas. Interestingly, the entomological data indicated that the population density of *An. gambiae* was similar before and after the introduction of ITNs use, suggesting that exposure to *An. gambiae* was similar in the study periods (2005 and 2006; i.e., that the analysis of anti-saliva IgG responses could represent a real evaluation of human–vector contact). This individual approach seems to be complementary to entomological methods and also contributes information about the real intensity of bites by anthropophilic *Anopheles*. In addition, anti-saliva IgG responses showed similar trends in all three of the age groups studied (< 7 years, 7 –14 years, and > 14 years) before and after the introduction of ITNs. This result according to age is surprising in regard to the general immune response to specific antigens, which is known to be acquired progressively with age. This particular property of anti-saliva Ab could be caused by a particular short-time "life" of anti-saliva IgG response. Indeed, this kind of Ab immunity does not seem to accumulate with exposure during individual life but wanes rapidly, even with sustained exposure.[28,33] Nevertheless, these preliminary results according to age have to be confirmed, but they suggest that the use of this "saliva" biomarker could be relevant at all ages; this enhances the relevance of this indicator, because it is also suggested in other areas.[31] Deltamethrin, like most pyrethroid insecticides, has a powerful repulsive effect and is an effective mosquito killer (knockdown effect), but resistance has spread in the last decade in Africa.[34] In this study, ITNs were not observed to have any effect on *Anopheles* density, as evaluated by entomological methods (CDC catches). This could be caused by any or a combination of three factors: (1) the light traps were not installed in rooms containing ITNs (close to mosquito nets) but in yards,[35] (2) CDC traps are not a good method of evaluating small changes in *Anopheles* density in a low-exposure area,[36] or (3) insecticide resistance is high in the studied area. Recent studies (Toto J-C, unpublished data) have indicated that *An. gambiae* in Lobito largely comprises the Savannah (S) form (82%) rather than the Mopti (M) form (18%). Because S form is well-known to be preferentially associated with phenomena of resistances to insecticides,[37] we can hypothesize that insecticide resistance could occur in the studied area. A hypothesis related to Kdr resistance is currently under investigation. Nevertheless, it underlines that the use of anti-saliva IgG responses as an indicator of ITN efficacy could be particularly applicable to areas of high levels of insecticide resistance where current entomological methods have numerous limitations because of changes in vector behavior.[38,39]

The present study focused on the evaluation of IgG Ab level to whole saliva of *An. gambiae*. The sensitivity and specificity of this type of biomarker will have to be enhanced, especially to overcome possible cross-reactions between the salivary proteins of *An. gambiae* and those of other arthropod vectors.[40] The subsequent step will be to identify specific immunogenic *Anopheles* proteins and evaluate the corresponding IgG Ab levels. Several potential candidate biomarkers of exposure to *An. gambiae* have been identified by our team,[41] among which one peptide (P1) of the *An. gambiae* gSG6 protein, is proving to be a reliable immuno-epidemiological marker of the intensity of *Anopheles* exposure.[33] The evaluation of anti–gSG6-P1 IgG response as a marker of ITN efficacy could be planned in the same studied population.

CONCLUSIONS

To identify new biomarkers for malaria-control programs, an efficient and adapted indicator is being sought to evaluate the ITN efficacy. An approach based on measuring IgG Ab responses to *An. gambiae* salivary proteins represents a new way to evaluate the efficacy of vector-control strategies in malaria. This work has also showed that immunological tests can be carried out on blood spots collected on filter paper. This technique is ideal for investigating malaria, because it can be combined with thick blood smears that evaluate *Plasmodium* load. The development of a "saliva" biomarker could represent an alternative way to obtain new criteria for measuring the efficacy of ITNs, which could be integrated with (1) the evaluation of new vector-control strategies (ITN use, household spraying, curtains, etc.) in phase 3 trials and (2) the monitoring of selected strategies by National MCPs. Finally, the development of such a biomarker could be applied to vector-control strategies against other major mosquito-borne diseases such as arboviroses (dengue and chikungunya).

Received November 13, 2009. Accepted for publication January 8, 2010.

Acknowledgments: The authors gratefully acknowledge the population of the Bella Vista area (Lobito, Angola) for their participation in this study, the technical personal of the Malaria Control Program team, especially Maria Chilombo (Société Nationale de Métallurgie (SONAMET) Lobito), and Amady Ndiaye and Souleymane Doucoure from the Institut de Recherche pour le Développement (IRD)-Epidemiology of Vectors (EPIVECT) group for their technical support. The authors thank Dr. Jean-François Foucher from Acer-Energy (ACERGY) Company for his helpful contribution.

Financial support: Papa M. Drame was supported by a fellowship provided by Institut de Recherche pour le Développement (IRD) (Département Soutien et Formation). Anne Poinsignon was supported by fellowships provided by the Research Ministry of France and François Lacoste. Sylvie Cornelie was supported by a fellowship from the Inkerman Foundation. This work was supported by Acer-Energy (ACERGY)-Société Nationale de Métallurgie (SONAMET) Company (Malaria Control Program), the French Ministry of Defense (Délégation Générale pour l'Armement, DGA), and the IRD.

Authors' addresses: Papa Makhtar Drame, IRD/CREC, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Bénin, E-mail: papa-makhtar.drame@ird.fr. Anne Poinsignon, IRD-UR016, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, E-mail: a.poinsignon@uq.edu.au. Patrick Besnard, Sonamet Company, 15 Rua 1° dezembro, CP 479, Lobito, Benguela Provincia, Angola, E-mail: prbesnard@yahoo.fr. Jacques Le Mire, Sonamet Company, 15 Rua 1° dezembro, CP 479, Lobito, Benguela Provincia, Angola, E-mail: drjlemire@yahoo.fr. Maria A. Dos-Santos, Sonamet Company, 15 Rua 1° dezembro, CP 479, Lobito, Benguela Provincia, Angola, E-mail: doctor.lobito@sonamet.com. Cheikh S. Sow, Espoir pour la Santé, St. Louis, Sénégal, E-mail: cheikh.sow@espoir-sante.org. Sylvie Cornélie, IRD-UR016, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, E-mail: sylvie.cornelie@ird.fr. Vincent Foumane, LRP-OCEAC, Yaoundé, Cameroun, E-mail: vfoumane@yahoo.fr.

Jean-Claude Toto, LRP-OCEAC, Yaoundé, Cameroun, E-mail: jctotofr@yahoo.fr. Mbacké Sembène, Département de Biologie Animale, BP 5005, FST-UCAD, Dakar, Sénégal, E-mail: sembene@ird.sn. Denis Boulanger, IRD-UMR145, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, E-mail: denis.boulanger@ird.fr. Francois Simondon, IRD-UMR145, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, E-mail: FSimondon@spmsd.com. Filomeno Fortes, National Malaria Control Program, National Institute of Public Health, Ministry of Health, Luanda, Angola, E-mail: filomenofortes@gmail.com. Pierre Carnevale, IRD-UR016, BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France, E-mail: pjcarnevale@gmail.com. Franck Remoue, IRD/CREC, 01 BP 4414 RP, Cotonou, Bénin, E-mail: franck.remoue@ird.fr..

REFERENCES

1. WHO-UNICEF, 2005. *World Malaria Report 2005*. Available at: www.rollbackmalaria.org. Accessed July 2009.
2. Lengeler C, 2004. Insecticide-treated nets for malaria control: real gains. *Bull World Health Organ 82:* 85–91.
3. Hemingway J, Bates I, 2003. Malaria: past problems and future prospects. After more than a decade of neglect, malaria is finally back on the agenda for both biomedical research and public health politics. *EMBO Rep 4:* S29–S31.
4. Maxwell CA, Msuya E, Sudi M, Njunwa KJ, Carneiro IA, Curtis CF, 2002. Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3–4 years on malarial morbidity in Tanzania. *Trop Med Int Health 7:* 1003–1008.
5. Hawley WA, Phillips-Howard PA, ter Kuile FO, Terlouw DJ, Vulule JM, Ombok M, Nahlen BL, Gimnig JE, Kariuki SK, Kolczak MS, Hightower AW, 2003. Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. *Am J Trop Med Hyg 68:* 121–127.
6. Carnevale P, Robert V, Snow R, Curtis C, Richard A, Boudin C, Pazart LH, Halna JM, Mouchet J, 1991. The impact of impregnated mosquito nets on prevalence and morbidity related to malaria in sub-Saharan Africa. *Ann Soc Belg Med Trop 71 (Suppl 1):* 127–150.
7. Carnevale P, Robert V, Boudin C, Halna JM, Pazart L, Gazin P, Richard A, Mouchet J, 1988. Control of malaria using mosquito nets impregnated with pyrethroids in Burkina Faso. *Bull Soc Pathol Exot 81:* 832–846.
8. Nevill CG, Some ES, Mung′ala VO, Mutemi W, New L, Marsh K, Lengeler C, Snow RW, 1996. Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. *Trop Med Int Health 1:* 139–146.
9. Killeen GF, Smith TA, Ferguson HM, Mshinda H, Abdulla S, Lengeler C, Kachur SP, 2007. Preventing childhood malaria in Africa by protecting adults from mosquitoes with insecticide-treated nets. *PLoS Med 4:* e229.
10. Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, Maude GH, Armah GE, Kajihara B, Adiamah JH, Smith PG, 1996. Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. *Trop Med Int Health 1:* 147–154.
11. Binka FN, Indome F, Smith T, 1998. Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. *Am J Trop Med Hyg 59:* 80–85.
12. Lengeler C, 2004. Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. *Cochrane Database Syst Rev 2,* Art. No.: CD000363. Available at: www.cochrane.org/reviews/.../ab000363.html. Accessed July 2009.
13. Chouaibou M, Simard F, Chandre F, Etang J, Darriet F, Hougard JM, 2006. Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against *Anopheles funestus* and pyrethroid-resistant *Anopheles gambiae* in north Cameroon. *Malar J 5:* 77.
14. Smith T, Killeen G, Lengeler C, Tanner M, 2004. Relationships between the outcome of *Plasmodium falciparum* infection and the intensity of transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg 71:* 80–86.
15. Noor AM, Moloney G, Borle M, Fegan GW, Shewchuk T, Snow RW, 2008. The use of mosquito nets and the prevalence of *Plasmodium falciparum* infection in rural South Central Somalia. *PLoS One 3:* e2081.
16. Schwartz BS, Ribeiro JM, Goldstein MD, 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *Am J Epidemiol 132:* 58–66.
17. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A, 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J Exp Med 161:* 332–344.
18. Ribeiro JM, Francischetti IM, 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu Rev Entomol 48:* 73–88.
19. Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN, Teixeira AR, 2001. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *Am J Trop Med Hyg 65:* 219–226.
20. Lane RS, Moss RB, Hsu YP, Wei T, Mesirow ML, Kuo MM, 1999. Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. *Am J Trop Med Hyg 61:* 850–859.
21. Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P, 2005. Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. *Parasitology 130:* 493–499.
22. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro JM, 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? *Am J Trop Med Hyg 62:* 740–745.
23. Poinsignon A, Remoue F, Rossignol M, Cornelie S, Courtin D, Grebaut P, Garcia A, Simondon F, 2008. Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. *Am J Trop Med Hyg 78:* 750–753.
24. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyanij M, Ruiz-Maldonado R, Love A, Francois G, Palosuo T, 1994. Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of *Aedes communis* and *Aedes aegypti* mosquitoes in children. *Int Arch Allergy Immunol104*: 366–371.
25. Remoue F, Alix E, Cornelie S, Sokhna C, Cisse B, Doucoure S, Mouchet F, Boulanger D, Simondon F, 2007. IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Trop 104:* 108–115.
26. Peng Z, Rasic N, Liu Y, Simons FE, 2002. Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. *J Allergy Clin Immunol 110:* 816–817.
27. Das MK, Mishra A, Beuria MK, Dash AP, 1991. Human natural antibodies to *Culex quinquefasciatus*: age-dependent occurrence. *J Am Mosq Control Assoc 7:* 319–321.
28. Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve JP, Boulanger D, Simondon F, 2006. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg 100:* 363–370.
29. Cuamba N, Choi KS, Townson H, 2006. Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the *Anopheles gambiae* complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (kdr) status and *Plasmodium falciparum* sporozoite rates. *Malar J 5:* 2.
30. Calzetta M, Santolamazza F, Carrara GC, Cani PJ, Fortes F, Di Deco MA, della Torre A, Petrarca V, 2008. Distribution and chromosomal characterization of the *Anopheles gambiae* complex in Angola. *Am J Trop Med Hyg 78:* 169–175.
31. Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L, Udomsangpetch R, 2006. Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Trop 98:* 66–73.
32. Noor AM, Mutheu JJ, Tatem AJ, Hay SI, Snow RW, 2009. Insecticide-treated net coverage in Africa: mapping progress in 2000-07. *Lancet 373:* 58–67.
33. Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, Cisse B, Sokhna C, Arca B, Simondon F, Remoue F, 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS One 3:* e2472.
34. Darriet F, Guillet P, N′Guessan R, Doannio JM, Koffi A, Konan LY, Carnevale P, 1998. Impact of resistance of *Anopheles gambiae* s.s. to permethrin and deltamethrin on the efficacy of impregnated mosquito nets. *Med Trop 58:* 349–354.
35. Mboera LE, Kihonda J, Braks MA, Knols BG, 1998. Short report: influence of centers for disease control light trap position,

relative to a human-baited bed net, on catches of *Anopheles gambiae* and *Culex* quinquefasciatus in Tanzania. *Am J Trop Med Hyg 59:* 595–596.

36. Mbogo CN, Glass GE, Forster D, Kabiru EW, Githure JI, Ouma JH, Beier JC, 1993. Evaluation of light traps for sampling anopheline mosquitoes in Kilifi, Kenya. *J Am Mosq Control Assoc 9:* 260–263.
37. Chandre F, Manguin S, Brengues C, Dossou Yovo J, Darriet F, Diabate A, Carnevale P, Guillet P, 1999. Current distribution of a pyrethroid resistance gene (kdr) in *Anopheles gambiae* complex from West Africa and further evidence for reproductive isolation of the Mopti form. *Parassitologia 41:* 319–322.
38. N′Guessan R, Corbel V, Akogbeto M, Rowland M, 2007. Reduced efficacy of insecticide-treated nets and indoor residual spraying for malaria control in pyrethroid resistance area, Benin. *Emerg Infect Dis 13:* 199–206.
39. Mbogo CN, Baya NM, Ofulla AV, Githure JI, Snow RW, 1996. The impact of permethrin-impregnated bednets on malaria vectors of the Kenyan coast. *Med Vet Entomol 10:* 251–259.
40. Poinsignon A, Cornelie S, Remoue F, Grebaut P, Courtin D, Garcia A, Simondon F, 2007. Human/vector relationships during human African trypanosomiasis: initial screening of immunogenic salivary proteins of Glossina species. *Am J Trop Med Hyg 76:* 327–333.
41. Cornelie S, Remoue F, Doucoure S, Ndiaye T, Sauvage FX, Boulanger D, Simondon F, 2007. An insight into immunogenic salivary proteins of *Anopheles gambiae* in African children. *Malar J 6:* 75.

Tropical Medicine and International Health doi:10.1111/j.1365-3156.2010.02611.x

VOLUME 15 NO 10 PP 1198–1203 OCTOBER 2010

First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an immuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to *Anopheles funestus* bites

Anne Poinsignon[1], Badara Samb[2,3], Souleymane Doucoure[1], Papa-Makhtar Drame[1], Jean Biram Sarr[4], Cheikh Sow[1], Sylvie Cornelie[1], Sophie Maiga[4], Cheikh Thiam[4], François Rogerie[4], Sohidou Guindo[4], Emmanuel Hermann[4], François Simondon[1], Ibrahima Dia[3], Gilles Riveau[4], Lassana Konate[2] and Franck Remoue[1]

1 *Unité Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs, Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France*
2 *Laboratoire d'Ecologie vectorielle et Parasitaire, Département de Biologie Animale, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal*
3 *Laboratoire d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Dakar, Dakar, Senegal*
4 *ONG Espoir Pour La Santé, Saint-Louis, Senegal*

Summary

OBJECTIVE The development of a biomarker of exposure based on the evaluation of the human antibody response specific to *Anopheles* salivary proteins seems promising in improving malaria control. The IgG response specific to the gSG6-P1 peptide has already been validated as a biomarker of *An. gambiae* exposure. This study represents a first attempt to validate the gSG6-P1 peptide as an epidemiological tool evaluating exposure to *An. funestus* bites, the second main malaria vector in sub-Saharan Africa.

METHODS A multi-disciplinary survey was performed in a Senegalese village where An. *funestus* represents the principal anopheline species. The IgG antibody level specific to gSG6-P1 was evaluated and compared in the same children before, at the peak and after the rainy season.

RESULTS Two-thirds of the children developed a specific IgG response to gSG6-P1 during the study period and – more interestingly – before the rainy season, when *An. funestus* was the only anopheline species reported. The specific IgG response increased during the *An. funestus* exposure season, and a positive association between the IgG level and the level of exposure to *An. funestus* bites was observed.

CONCLUSIONS The results suggest that the evaluation of the IgG response specific to gSG6-P1 in children could also represent a biomarker of exposure to *An. funestus* bites. The availability of such a biomarker evaluating the exposure to both main *Plasmodium falciparum* vectors in Africa could be particularly relevant as a direct criterion for the evaluation of the efficacy of vector control strategies.

keywords *Anopheles*, salivary protein, environmental exposure, biological marker, Senegal

Introduction

The threat from malaria, the leading cause of children mortality in sub-Saharan Africa, is prompting research in developing new tools for efficient control. Current control measures combine anti-*Plasmodium* treatment supported by artemisinin-based combination therapy with anti-*Anopheles* interventions such as the use of bed nets (long-lasting insecticidal nets) and household insecticides. These control measures have already reduced the number of malaria cases and deaths in some areas (Unicef and Roll Back Malaria 2009), but continued effort is needed to elevate the current level of control to elimination and eradication. Such progress requires improvement of current malaria risk evaluations and the development of new prevention and case-management technologies.

The development of new tools to evaluate the level of exposure to arthropod vector bites shows promise. New initiatives such as mapping spatial limits for human malaria parasites and determining the relative geographical frequency distribution of the *Anopheles* vector provide information for malaria control (Hay *et al.* 2010). Further, epidemiological studies linked to the antigenic properties of arthropod salivary proteins have shown that quantification of the human antibody (Ab)

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

response specific to arthropod salivary proteins is a potential biomarker for exposure to vector bites in an exposed population (Remoue *et al.* 2005; Billingsley *et al.* 2006). This research topic has been investigated for several vectors that carry human pathogens such as ticks (Schwartz *et al.* 1990), *Aedes* (Remoue *et al.* 2007), *Glossina* (Poinsignon *et al.* 2008b), *Triatoma* (Nascimento *et al.* 2001) and *Anopheles* (Remoue *et al.* 2006; Waitayakul *et al.* 2006). Such epidemiological biomarkers of exposure could be geographical indicators for the risks of disease transmission and may serve as tools for evaluating the effectiveness of a vector control programme (Schwarz *et al.* 2009; Drame *et al.* 2010). Interestingly, it has been demonstrated that the IgG response specific to the gSG6-P1 peptide is a specific biomarker for *Anopheles gambiae s.l.* exposure (Poinsignon *et al.* 2008a). The salivary peptide was based on *An. gambiae s.s.* SG6 protein sequence and has as yet only been validated in an epidemiological context where *An. gambiae* complex species were the only anopheline species (Poinsignon *et al.* 2008a, 2009). The specificity of this peptide to the *Anopheles* genus allows the specific evaluation of the human-*Anopheles* contact, i.e. removing possible cross-reactivity with other salivary proteins from other arthropod vectors such as *Aedes*, *Culex* and *Glossina*.

In sub-Saharan countries, *An. funestus* is the second major malaria vector. This species occupies a broad range of ecological niches, is highly anthropophilic and abounds during the dry season when *An. gambiae s.l.* densities are low. In most sites, *An. funestus* appears to maintain malaria transmission when exposure to *An. gambiae s.l.* subsides. Because the three major malaria vectors in Africa, *An. gambiae s.s.*, *An. arabiensis* and *An. funestus* geographically co-inhabit across most of sub-Saharan countries (Manguin *et al.* 2008), an optimal exposure biomarker needs to reflect exposure to several *Anopheles* species. Indeed, anopheline species responsible for *Plasmodium falciparum* transmission can shelter in the same house and therefore blood-feed on the same individuals. The genome of *An. gambiae* and *An. funestus* is closely related (Coetzee & Fontenille 2004) and as previously reported, the salivary peptide gSG6-P1 shares 91% identity with *An. funestus* (Poinsignon *et al.* 2008a).

Malaria transmission in the northern part of Senegal is low, unstable, geographically restricted and seasonal with an average of 2–7 infective bites/person/year (Faye *et al.* 1998). However, the construction of two dams has decreased the salinity gradient along the Senegal River; it is thought that this has contributed to the reappearance of *An. funestus* in the Senegal River Basin, which had disappeared during a drought in the 1970s (Konate *et al.* 2001).

The aim of this study was to evaluate the use of the *An. gambiae* gSG6-P1 salivary biomarker in areas where malaria transmission is assumed by *An. funestus*. To this end, fieldwork was carried out in a northern Senegalese village where *An. funestus* was reported as the predominant species by classical entomological trapping (Dia *et al.* 2008). This study focused on the evaluation of IgG Ab response to gSG6-P1 peptide in children.

Material and methods

Study population

The study was conducted in the north of Senegal, in Gankette Balla village located along the Senegal River Basin, on the shores of the Guiers Lake. This area is a dry savannah, with rainy season from July to October, and therefore represents a typical area of the Sahelian and sub-Sahelian regions of Africa, with approximately 400 mm of rain per year. In this village, malaria transmission is seasonal from September to December.

A longitudinal study was performed in 2004 in this village and a cohort of 173 children aged 1–9 years old was followed, as previously described (Dia *et al.* 2008). Triplets of sera from a sub-sample (n = 87) of the same children were available from three passages (June, September and December 2004). For each child, parasitological measurements of malaria (identification of *Plasmodium* species and the level of intensity of infection) were performed at each passage using thick blood smears obtained by finger-prick. In the same way, capillary blood collection was completed for each child at each passage for immunological assessment.

This study followed ethical principles according to the Helsinki Declaration and was approved by the Ethical Committee of the Ministry of Health of Senegal (CNRS, June 2004). Informed consent was obtained from the parents of the children.

Entomological data

Adult mosquitoes were collected in June, September and December 2004 (corresponding respectively to the beginning, the peak and after the rainy season) using human-landing catches as previously described (Dia *et al.* 2008). Mosquitoes caught were counted and identified morphologically to *Anopheles* species (Gillies & De Meillon 1968). *Anopheles* infection rate was studied by Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) for *P. falciparum* circumsporozoite antigen (CSP). The number of bites per

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

human per night (BHN) was calculated by dividing the number of mosquitoes caught by the total person-night used for the month survey.

Salivary peptide gSG6-P1

The gSG6-P1 peptide was designed using bioinformatics to maximize its *Anopheles* specificity and its antigenicity, as previously described (Poinsignon *et al.* 2008a). The gSG6-P1 peptide was synthesized, purified (>80%) by Genosys (Sigma-Genosys, Cambridge, UK). All peptides were shipped in lyophilized form and then resuspended in 0.22 μm ultra-filtered water and frozen in aliquots at −80 °C until use for immunological tests (ELISA).

Evaluation of human IgG antibody level (ELISA)

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays were carried out on the individual sera to measure the level of IgG Ab reacting to the gSG6-P1 antigen as described by Poinsignon *et al.* (2008a). Briefly, Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gSG6-P1 (20 μg/ml) in phosphate buffer saline (PBS). After washing (distilled water + Tween-0.1%), each serum was incubated in duplicate at 4 °C overnight at a 1/20 dilution (in PBS–Tween-1%). This optimal dilution was determined after several preliminary experiments. Mouse biotinylated Ab to human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was incubated at a 1/1000 dilution (1 h 30 min at 37 °C) and peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham, Les Ulis, France) was then added (1/1000; 1 h at 37 °C). Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2′-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulphonic acid) diammonium; Sigma, St Louis, MO, USA) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H_2O_2. Optical density (OD) was measured at 405 nm. Each test sample was assessed in duplicate wells and, in parallel, in a blank well containing no gSG6-P1 antigen (ODn) to control for non-specific reactions in the plasma and the reagents. Individual results were expressed as ΔOD value calculated according to the formula ΔOD = ODx − ODn, where ODx represents the mean of individual OD in both antigen wells, as previously used (Poinsignon *et al.* 2008a).

Statistical analysis

All data were analysed with GraphPad Prism software® (San Diego, CA, USA). After ensuring that the results did not have a normal distribution, the Wilcoxon matched pair test was used to compare paired sera of individuals. Differences were considered statistically significant when *P*-values were <0.05.

Results and discussion

Because it has been previously demonstrated that the specific IgG response to gSG6-P1 salivary peptide was an immunological biomarker of the exposure level to *An. gambiae* bites, this study evaluated if the same peptide biomarker could be applied to detect exposure to *An. funestus*, another main vector of *P. falciparum* in Africa. The IgG response specific to the gSG6-P1, derived from the *An. gambiae* SG6 salivary protein, was followed in the same children before (June), at the peak (September) and after (December) the rainy season in a village where *An. funestus* represented the large major *Anopheles species*.

Entomological data in Gankette Balla, including the study period, have previously been presented and *An. funestus* has been reported as the main *P. falciparum* vector (Dia *et al.* 2008). In summary, human-landing catches have sampled several anopheline species in this village, with *An. funestus* largely predominant. *An. gambiae s.l.* (*An. arabiensis), An. pharoensis* and *An. wellcomei* were also collected, but in very low densities. During the study period, from June to December 2004, the average of *An. funestus* BHN, calculated from the surveys, was estimated to 9.8 before the rainy season (June) and to 117 and 96.3 in September and in December, respectively (Figure 1). Whereas *An. funestus* larvae develop in permanent or semi-permanent water collections, its dynamic was associated positively with the rainfall during the study. For the same period, the human biting rate for *An. arabiensis* species was reported to be very low, 0.17 BHN in September and 0.5 in December. No *An. arabiensis* were

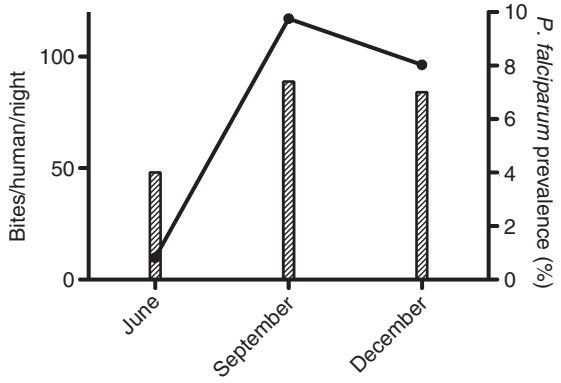


Figure 1 *Anopheles funestus* density and *Plasmodium falciparum* prevalence. Continuous line indicates the temporal dynamic level of exposure to *An. funestus* vector in Gankette Balla. Columns indicate the *P. falciparum* prevalence in all children (n = 173) from the initial study (Dia *et al.* 2008).

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

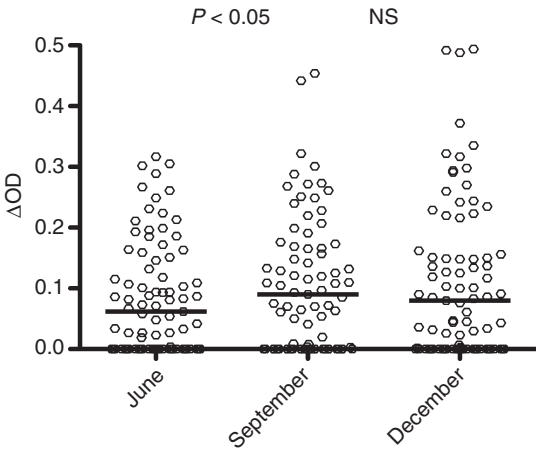


Figure 2 Individual IgG antibody levels specific to gSG6-P1 according to month. Individual ΔOD results are presented, and bars indicate the median value for each month. Statistical significance between months is indicated (Wilcoxon matched pair test).

collected in June. Additionally, among anopheline species, only *An. funestus* was positive for *P. falciparum* CSP antigen (Dia *et al.* 2008).

The *P. falciparum* prevalence in children under 9 years old was also investigated (Figure 1). The parasite prevalence remained very low and was positively associated with the *An. funestus* bites rate level with an increase from the early [June, 4% (7/173)] to the peak [September, 7.4% (10/135)] of the rainy season, a level maintained until December [7% (11/156)]. Four per cent of the children presented a positive *P. falciparum* infection in June, before the beginning of the raining season when *An. funestus* was the only anopheline species in Gankette Balla. Indeed, larvae from *An. gambiae* complex typically breed in temporary rain-dependant pools, and as reported, no *An. arabiensis* mosquitoes were sampled in June. This suggests that *An. funestus* was the malaria vector before and in the early rainy season.

In parallel, the IgG response specific to the gSG6-P1 peptide was evaluated in the same children in June, September and in December (Figure 2). Two-thirds of the children presented an IgG response specific to gSG6-P1 during the study period, even in June when inhabitants were mainly exposed to *An. funestus* bites. Therefore, the development of the observed specific IgG response in the children could result in an antigenic stimulation following specific *An. funestus* bites.

The evolution of the IgG response to gSG6-P1 was compared between June, September and December (Figure 2). The specific IgG response was significantly higher in September (median = 0.090), corresponding to the peak of *An. funestus* exposure, when compared to June (median = 0.062; $P = 0.02$). From September to December (median = 0.080), the specific IgG response level decreased (not significantly) but remained higher than June. It appears that the IgG response level varied positively with *An. funestus* densities as evaluated by entomological sampling. Altogether these results suggested that the evaluation of the IgG response specific to the gSG6-P1 salivary peptide in children could also represent a pertinent biomarker of exposure to *An. funestus* bites.

The SG6-P1 peptide sequences between *An. gambiae* and *An. funestus* share a high level of identity. Their sequences differ only by the substitution of two amino acids, being asparagine by glutamine (position 9) and leucine by an isoleucine (position 15) between *An. gambiae* and *An. funestus*, respectively (Figure 3). The different amino acids from fSG6-P1 are closed in terms of polarity and charge to those from *An. gambiae* gSG6-P1. This observation, when considered in conjunction with present results, suggests that these substitutions do not alter the synthesis and the recognition of specific Ab because this epitope appears to be conserved.

An. arabiensis mosquitoes were reported to be present in very low densities in September and in December. In a previous study, the gSG6-P1 salivary peptide has been suggested as a useful sensitive epidemiological tool for identifying individuals exposed to very low *An. arabiensis* densities in Senegal (Poinsignon *et al.* 2009). Therefore, we cannot rule out that a part of the IgG response specific to gSG6-P1 observed in September and December was the result of antigenic stimulation following *An. arabiensis* bites. Nevertheless, the IgG response specific to gSG6-P1

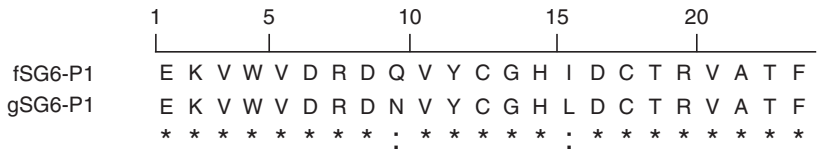


Figure 3 Sequences of the SG6-P1 salivary peptide. Sequences are shown for *Anopheles funestus* (fSG6-P1) and for *An. gambiae* (gSG6-P1). Identities are marked with '*' and strong amino-acid conservations with ':'.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

observed in June can be attributed to *An. funestus* bites exposure regarding entomological data.

Concerning the potential applications of such an epidemiological tool of vector exposure to the malaria vector, it could be particularly relevant to have a unique indicator for evaluating the exposure to the major anopheline vector species. Such a tool could be easily applied on field conditions as a rapid diagnostic test to evaluate the exposure of human populations to African malaria vectors. In complement, it could be also a hypothesis to develop a specific biomarker of exposure to *An. gambiae vs. An. funestus*. Indeed, preliminary results from our group suggested some immunogenic salivary proteins could be different between both species (S. Cornelie, unpublished data). The identification of such species-specific salivary candidates as biomarkers is currently under investigation.

This study is the first attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an epidemiological tool to evaluate exposure to *An. funestus* bites. The availability of such a biomarker to allow the evaluation of the exposure to both main *P. falciparum* vectors in Africa could represent a very useful epidemiological tool for malaria control. Such a biomarker can evaluate exposure specific to *Anopheles* species in areas where different species of malaria vector co-inhabit.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the population of Gankette Balla for their participation in this study and the team of the 'Pal-Fleuve program'. A Poinsignon was supported by a scholarship provided by the Research Ministry of France and a fellowship from Francois Lacoste. JB Sarr holded a fellowship from the Conseil Regional de Saint-Louis, Senegal. This research was supported by the CGGVeritas Compagny and by the Pal+ program (French Ministry of Research). The authors thank the FSD 'Fonds Social de Développement', Embassy of France in Senegal for their financial participation.

References

Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA & Drakeley C (2006) Immune interactions between mosquitoes and their hosts. *Parasite Immunology* **28**, 143–153.

Coetzee M & Fontenille D (2004) Advances in the study of *Anopheles funestus*, a major vector of malaria in Africa. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **34**, 599–605.

Dia I, Konate L, Samb B *et al.* (2008) Bionomics of malaria vectors and relationship with malaria transmission and epidemiology in three physiographic zones in the Senegal River Basin. *Acta Tropica* **105**, 145–153.

Drame P, Poinsignon A, Besnard P *et al.* (2010) Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of Insecticide-Treated Nets in malaria vector control. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **83**, 115–121.

Faye O, Gaye O, Konate L, Molez JF, Feller-Dansokho E & Herve JP (1998) Prediction and prevention of malaria epidemics in the valley of the Senegal River. *Sante* **8**, 347–352.

Gillies MT & De Meillon B (1968) *The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region)* The South African Institute for Medical Research, Johannesburg.

Hay SI, Sinka ME, Okara RM *et al.* (2010) Developing global maps of the dominant anopheles vectors of human malaria. *Plos Medicine* **7**, e1000209.

Konate L, Diop A, Sy N *et al.* (2001) Comeback of *Anopheles funestus* in Sahelian Senegal. *Lancet* **358**, 336.

Manguin S, Carnevale P & Mouchet J (2008) *Biodiversity of Malaria in the World* John Libbey Eurotext, Paris.

Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN & Teixeira AR (2001) Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **65**, 219–226.

Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M *et al.* (2008a) Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to *Anopheles* bites. *PLoS ONE* **3**, e2472.

Poinsignon A, Remoue F, Rossignol M *et al.* (2008b) Human IgG antibody response to *Glossina* saliva: an epidemiologic marker of exposure to *Glossina* bites. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **78**, 750–753.

Poinsignon A, Cornelie S, Ba F *et al.* (2009) Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to *Anopheles* bites. *Malaria Journal* **8**, 198.

Remoue F, Cornelie S, NGom A, Boulanger D & Simondon F (2005) Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. In: *Update in Tropical Immunology* (ed O Garraud) Transworld research Network, Fort P.O. Trivandrum, Herala, India. pp. 377–400.

Remoue F, Cisse B, Ba F *et al.* (2006) Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **100**, 363–370.

Remoue F, Alix E, Cornelie S *et al.* (2007) IgE and IgG4 antibody responses to *Aedes* saliva in African children. *Acta Tropica* **104**, 108–115.

Schwartz BS, Ribeiro JM & Goldstein MD (1990) Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. *American Journal of Epidemiology* **132**, 58–66.

Schwarz A, Helling S, Collin N *et al.* (2009) Immunogenic salivary proteins of *Triatoma infestans*: development of a recombinant antigen for the detection of low-level infestation of triatomines. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**, e532.

Unicef & Roll Back Malaria (2009) *Malaria and Children: Progress in Intervention Coverage*. New-York, USA.

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L & Udomsangpetch R (2006) Natural human humoral response to salivary gland proteins of *Anopheles* mosquitoes in Thailand. *Acta Tropica* **98**, 66–73.

Corresponding Author **Anne Poinsignon,** Unité UR 016 'Caractérisation et Contrôle des Populations de Vecteurs' – Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Montpellier, France. E-mail: a.poinsignon@uq.edu.au

© 2010 Blackwell Publishing Ltd

OPEN ACCESS Freely available online

PLoS one

Human Antibody Responses to the *Anopheles* Salivary gSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control

Papa Makhtar Drame[1]*, Anne Poinsignon[2], Patrick Besnard[3], Sylvie Cornelie[2], Jacques Le Mire[3], Jean-Claude Toto[4], Vincent Foumane[4], Maria Adelaide Dos-Santos[3], Mbacké Sembène[5], Filomeno Fortes[6], Francois Simondon[7], Pierre Carnevale[2], Franck Remoue[1]

1 UR016 « Contrôle et Caractérisation des Populations de Vecteurs », Institut de Recherche pour le Développement, Cotonou, Benin, **2** UR016 « Contrôle et Caractérisation des Populations de Vecteurs », Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France, **3** Malaria Control Program-SONAMET Clinic, Lobito, Angola, **4** Laboratoire de Recherche pour le Paludisme, Organisation de Coordination pour la lutte contre les Endémies en Afrique Centrale, Yaoundé, Cameroun, **5** Department of Animal Biology, Cheikh Anta DIOP University, Dakar, Senegal, **6** Malaria Control Program, Ministry of Public Health, Luanda, Angola, **7** UMR145 « VIH/SIDA et maladies associées », Institut de Recherche pour le Développement, Montpellier, France

Abstract

To optimize malaria control, WHO has prioritised the need for new indicators to evaluate the efficacy of malaria vector control strategies. The gSG6-P1 peptide from gSG6 protein of *Anopheles gambiae* salivary glands was previously designed as a specific salivary sequence of malaria vector species. It was shown that the quantification of human antibody (Ab) responses to *Anopheles* salivary proteins in general and especially to the gSG6-P1 peptide was a pertinent biomarker of human exposure to *Anopheles*. The present objective was to validate this indicator in the evaluation of the efficacy of Insecticide Treated Nets (ITNs). A longitudinal evaluation, including parasitological, entomological and immunological assessments, was conducted on children and adults from a malaria-endemic area before and after the introduction of ITNs. Significant decrease of anti-gSG6-P1 IgG response was observed just after the efficient ITNs use. Interestingly, specific IgG Ab level was especially pertinent to evaluate a short-time period of ITNs efficacy and at individual level. However, specific IgG rose back up within four months as correct ITN use waned. IgG responses to one salivary peptide could constitute a reliable biomarker for the evaluation of ITN efficacy, at short- and long-term use, and provide a valuable tool in malaria vector control based on a real measurement of human-vector contact.

Citation: Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Cornelie S, Le Mire J, et al. (2010) Human Antibody Responses to the *Anopheles* Salivary gSG6-P1 Peptide: A Novel Tool for Evaluating the Efficacy of ITNs in Malaria Vector Control. PLoS ONE 5(12): e15596. doi:10.1371/journal.pone.0015596

Editor: Etienne Joly, Université de Toulouse, France

Received August 17, 2010; **Accepted** November 15, 2010; **Published** December 14, 2010

Copyright: © 2010 Drame et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: Papa-Makhtar Drame was supported by a fellowship provided by the IRD (Département Soutien et Formation). Anne Poinsignon was supported by fellowships provided by the Research Ministry of France then by François Lacoste (Fonds Inkermann). This work was supported by ACERGY-SONAMET Company (Malaria Control Program), the French Ministry of Defense (Délégation Générale pour l'Armement) and the IRD (Département Expertise et Valorisation). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Funding received from ACERGY-SONAMET (a commercial company), as from the other funders, is not accompagnied by any other relevant declarations relating to employment, consultancy, patents, products in development or marketed products and does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: papa-makhtar.drame@ird.fr

Introduction

Vector-borne diseases constitute major public health problems in developing countries and currently present high risks of re-emergence in the developed world. Developing tools for disease control is a priority, especially new anti-vector strategies to prevent transmission. Among these diseases, malaria represents the greatest worldwide problem, causing at least 400 million acute cases every year with around 1 million deaths [1]. Most of these deaths occur in children from Sub-Saharan Africa and are due to *Plasmodium falciparum* species. In these areas, the *Anopheles gambiae* complex is the major vector [2].

Preventive methods are used against both parasite (chemoprophylaxis) and vector (insecticide-based control). Among anti-vector strategies, Insecticide Treated Nets (ITNs) are currently the most efficient strategy for reducing human exposure to the vector, *Plasmodium* transmission and malaria morbidity [3,4,5]. When correctly used, even moderate coverage of populations (35–65%) can afford substantial community benefit as well as personal protection [6,7,8,9]. Moreover, implementation of Long-Lasting Insecticidal Nets (LLINs) represents an achievable means of rapidly improving ITN coverage [10]. The evaluation of ITN efficacy is currently based on entomological methods (entomological inoculation rate, *Anopheles* abundance and agressivity) and, in humans, on parasitological and clinical assessments [4,11,12]. The reference WHO method for phase 3 evaluation of ITNs efficacy is based on the measurement of *P. falciparum* density in human populations [12]. However, these methods present limitations when it comes to large-scale field studies, especially when transmission rates and exposure levels are low (dry season, high altitude, urban settings or after vector control). Moreover, evaluating *Plasmodium* density in human individuals is labour-intensive by active follow-up of populations. Entomological methods are mainly applicable at the population/area level and

do not give a measure of the heterogeneity of individual exposure in a given area. Human-landing catch measurements (adult volunteers) are currently the reference method for evaluating individual human exposure but it raises ethical questions and it may not be relevant to children [13]. In addition, as exposure levels drop with ITNs use, all these monitoring methods become less effective for evaluation by National Malaria Control Programs [14].

In order to improve vector control, much effort is being devoted to developing new indicators to evaluate, at the individual level, the efficacy of control strategies. One promising approach is based on the idea that exposure to arthropod vector bites can be assessed by directly measuring real human-vector contact. Indeed, the human antibody (Ab) response to arthropod salivary proteins could give a measure of exposure to vector bites [15,16]. At the time of biting, the female mosquito injects saliva containing bioactive molecules which facilitate the blood meal and some of these are antigenic [17,18,19]. Human Ab responses to the saliva of various vectors, e.g. *Triatoma* (Chagas' disease) [20], *Ixodes* ticks (Borrelia) [21,22], phlebotomes (Leishmania) [23,24] and *Glossina* (African trypanosomiasis) [25] have been reported as reliable immunological markers for vector exposure. For mosquitoes, anti-saliva Ab responses has been related to exposure to *Culex*, *Aedes* [26,27,28,29], *An. gambiae* [30], *An. dirus* [31] and *An. darlingi* [32]. Recently, it has been shown that the Ab response to whole *An. gambiae* saliva could be a useful biomarker for evaluating ITN efficacy in phase 3 studies [33]. Even if this concept may appear to be valid, whole vector saliva could not be used, as pertinent indicator, because of i) potential cross-reactivity with salivary epitopes of other hematophagous arthropods; ii) lack of reproducibility between saliva batches and iii) the adequate production needed for large-scale studies. For use as a biomarker for *Anopheles* exposure, the specific [34,35] and antigenic [36] *Anopheles* SG6 salivary protein has been identified as an encouraging candidate [37]. The gSG6 protein, first identified in *An. gambiae* [38], was further reported as being highly conserved among *Anopheles* species [39,40]. To optimize this biomarker candidate, peptide design has recently been applied using bioinformatics approach to generate five *Anopheles* specific peptides (gSG6-P1 to gSG6-P5). Among them, only the gSG6-P1 peptide was validated as a specific biomarker of exposure to malaria vectors. Indeed, the level of human IgG to gSG6-P1 peptide evaluated the level of exposure to *An. gambiae* bites in human populations from a rural area in Senegal [37]. IgG response to this peptide has been also confirmed as biomarker for evaluating very low-level exposure to *An. gambiae* [41] as well as *An. funestus* (the second major malaria vector in Africa) [42]. In addition, the gSG6-P1 peptide can be easily synthesized in large quantity and offers an efficient solution to the lack of reproducibility observed with whole salivary extracts [37].

The present study addresses a potentially important application of such biomarker as a tool to evaluate the efficacy of ITN-based strategies. Human IgG responses to the gSG6-P1 peptide were evaluated before and after the introduction of ITNs in individuals living in a malaria-endemic area. The results focused on the biomarker's potential for evaluating short-term ITN efficacy.

Materials and Methods

Ethics Statement

This study was conducted in accordance with the Edinburgh revision of the Helsinki Declaration, and was approved by the National Malaria Control Program of the Ministry of Health of Angola (October 17th 2008), the only one Ethical authority in 2008 for approving studies on malaria research in Angola. Written informed consent (signed by the head of each household) was obtained for all individuals enrolled in the study, by the SONAMET Malaria Control Program (MCP) which supervise/control malaria infection of all workers for SONAMET and their family. This consent procedure was regularly approved by SONAMET workers, beneficing from several malaria studies/survey by MCP, and was approved by the involved Ethical authority in Angola.

Study population

This study was conducted in Lobito, a coastal city of Western Angola, from March 2005 to January 2007. The site is in the tropical savannah with a rainy season from October to May, with approximately 600–700 millimetres of rain per year. The duration of the malaria transmission season varies between 7 and 12 months with a peak between March and May. The major malaria vector is here the *An. gambiae s.l.* complex [43,44].

The population has been previously described [33]. Briefly, all workers of the SONAMET company lived in 250 households. Residents of these households were followed in the SONAMET in-patient clinic. In 2004, the presence of malaria parasite was diagnosed in sixty (60) households (positive, at least, in one member of household) by SONAMET Malaria Control Program (MCP). Twenty-one (21) of these 60 households were then randomly selected for the present study. These families lived in the Bella Vista district where exposure to *An. gambiae s.l* bites was relatively uniform. All residents of the 21 selected households, corresponding to two hundred and fifty (250) individuals (children and adults), were included for longitudinal follow-up, with evaluations every 6 weeks from March 2005 to January 2006 (before ITNs), and from April 2006 to January 2007 (after ITNs). The families were given LLIN treated with deltamethrin (Permanet®) in February 2006 (according to the number of rooms and beds per household). At each visit, samples were collected from each individual: thick blood smears for parasitological measurements and dried blood spots (on filter paper) for immunological analysis. Parasite density (parasitaemia) was calculated as the number of *P. falciparum* parasites per microliter of blood; mean parasitaemia values (x+1) were calculated [33]. Immunological tests were performed in a sub-sample (n = 105, children and adults) of the whole study population (n = 230). Individuals who missed more than 2 of the 14 visits (travel, illness, change of household,…) were excluded from the immunological assessments as described previously [33]. Filter papers were kept at +4°C in Silicagel before testing.

Entomological analysis and survey of ITN use

Mosquitoes were collected every six weeks during the study period at 6 reference households, representative of the studied area. *An. gambiae* density was evaluated using capture by CDC miniature light traps, deployed from 19:00 hours to 07:00 hours for two consecutive nights. PCR was used to confirm species to yield an estimate of the number of *An. gambiae*/trap/night.

After the introduction of ITNs, their use by individuals and their quality were inspected, the night before each blood sampling, by the MCP team. Information were then collected for all studied individuals by questionnaires, covering: i) the number of installed ITNs, ii) the number of exchanged ITNs and iii) the number of damaged ITNs (hole, torn, etc.), as previously described [33].

Salivary gSG6-P1 peptide

The gSG6-P1 peptide was designed as previously described [37], synthesized and purified (>95%) by Genepep SA (St-Clément de Rivière, France). All peptide batches were shipped in

lyophilized form and then suspended in 0.22 µm ultra-filtered water and frozen at −80°C until their use.

Evaluation of human IgG antibody levels (ELISA)

Standardized dried blood spots (1 cm diameter) were eluted by incubation in 300 µl of phosphate buffered saline (PBS–Tween-0.1%) at 4°C for 24 hours [33]. ELISAs were carried out on eluates to assay IgG to the gSG6-P1 antigen. Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gSG6-P1 (20 µg/mL) in PBS. Each eluate was then incubated (duplicate) at 4°C overnight at a 1/20 dilution (PBS–Tween-1%). This optimal dilution had been determined in preliminary experiments. Mouse biotinylated Ab against human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was incubated at a 1/2000 dilution and peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham, Les Ulis, France) was then added (1/2000) Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium; Sigma, St Louis, MO) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H_2O_2. Optical Density (OD) was measured at 405 nm. In parallel, each test sample was assessed in a blank well containing no gSG6-P1 antigen (ODn) to measure non-specific reactions. Individual results were expressed as the ΔOD value: ΔOD = ODx-ODn, where ODx represents the mean of individual OD in both antigen wells. Specific anti-gSG6-P1 IgG levels were also assayed in non-*Anopheles* exposed individuals (n = 14 – neg; North of France) in order to quantify the non-specific background Ab level and to calculate the specific immune response threshold (TR): TR = mean (ΔDO_{neg})+3SD = 0.204, i.e. an exposed individual was classified as a responder if its ΔOD>0.204.

Statistical analysis

All data were analyzed with GraphPad Prism4 software® (San Diego,CA, USA). After checking the non-Gaussian distribution, the non-parametric Mann-Whitney U-test was used to compare Ab levels between two independent groups, the Wilcoxon matched pairs test was used for comparison between two paired groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test for comparisons between more than two groups and the Chi-2 test to compare two proportions. All differences were considered significant at $P<0.05$.

Results

Anti-gSG6-P1 IgG responses before and after ITN use

The evolution of the percentage of "immune responders" (Fig. 1A) and the levels of anti-gSG6-P1 IgG Abs (Fig. 1B) were evaluated before (March 2005 to January 2006) and after (April 2006 to January 2007) the installation of ITNs (February 2006).

Before the introduction of ITNs, the percentage of anti-gSG6-P1 IgG responders appeared relatively constant according to months (64 to 81%) (Fig. 1A). Within two months of the ITNs introduction (April. 2006), the percentage of immune responders had decreased significantly ($P<0.0001$) down to 5% from 64% in January 2006. In parallel, the density of *An. gambiae* (classical entomological methods) and the intensity of *P. falciparum* infection (mean parasitaemia) are shown for the same period (Fig. 1A). Whereas peak of parasitaemia was observed in May 2005, only low-level infection was observed after the introduction of ITNs (2006). In particular, parasitaemia was lower in April 2006 compared to May 2005, which suggests that ITNs were effective, as previously described [33]. In addition, the densities of *An. gambiae* peaked in May 2005 with a small rise from October 2005. After the introduction of ITNs, a similar peak was observed (April to July 2006), indicating that entomological exposure was comparable in 2006 to that in 2005 in the studied area.

A similar trend was observed in the percentage of immune responders (Fig. 1A) and specific IgG Ab levels (Fig. 1B). In spite of inter-individual heterogeneity, the anti-gSG6-P1 IgG level was strong and relatively stable before the introduction of ITNs (Fig. 1B) although small but significant seasonal variations were seen in median specific IgG levels ($P<0.0001$). The major peak of Ab level was detected in May 2005, as observed for both entomological *An. gambiae* exposure and *P. falciparum* density (Fig. 1A). Immediately after the introduction of ITNs, a marked decrease in anti-gSG6-P1 IgG was observed between April and October 2006. Specific IgG levels were markedly lower in 2006 than in 2005 in June-July ($P<0.001$), August ($P<0.001$) and October ($P<0.001$). Interestingly, the greatest drop in Ab levels was observed in all individuals just two months after ITN introduction in April 2006, the month corresponding to the peak anti-IgG level before ITNs ($P<0.001$ for April 2006 compared to March-April 2005 and $P<0.0001$ for April 2006 compared to May 2005). The still positive Ab responses to gSG6-P1 (Fig. 1B) just after ITN installation (April and June-July 2006) were almost exclusively observed in older children and adults: the 5 responders in April 2006 and 15/16 responders in June-July 2006 were from 7-14 and >14 years age groups.

The percentage of specific immune responders (Fig. 1A) and the level of anti-gSG6-P1 IgG Ab (Fig. 1B) increased significantly in October 2006 compared to August 2006 ($P<0.001$) to reach a high level in December 2006 and January 2007, similar to that observed before ITN introduction in 2005. Interestingly, the major results of the ITN survey (loss rate and correct/damaged-usage rate) evaluated by two horizontal surveys (April and June/July 2006) indicated that: i) after just 4 months (June/July), only 63% of the ITNs were installed, and ii) only 53% were being used correctly (in use and undamaged), as previously described in detail [33].

Individual IgG responses to gSG6-P1 and short-term ITN efficacy

Previous analyses have been performed at the population level. To investigate changes in anti-gSG6-P1 IgG levels as a biomarker at the individual level and immediately after ITN installation, IgG level was individually evaluated just before (January 2006) and just after (April 2006) the introduction of ITNs (Figure 2). For almost all individuals, specific IgG levels decreased significantly in April 2006 compared to January 2006 ($P<0.0001$ – Fig. 2A). Other patterns - an increase or no change - were observed in only 5% of individuals. In addition, a new indicator of the January/April difference in IgG level was defined ($\Delta OD_{ITNs} = \Delta OD_{April} - \Delta OD_{January}$) to assess individual trends (positive, negative or unchanged) between both months (Fig. 2B). After applying a threshold for positive IgG response (ΔOD>0.204), 60% of individuals showed a decrease (ΔOD_{ITNs} <-0.204) whereas only 1% showed an increase (ΔOD_{ITNs} >0.204) and 39% (39/100) showed no significant change (-0.204<ΔOD_{ITNs} <+0.204).

Changes in anti-gSG6-P1 IgG responses according to age

The changes in anti-gSG6-P1 IgG level was analysed (Figure 3) according to age of individuals in 3 age groups: 0–6 (n = 49), 7–14 (n = 34) and >14 years (n = 25). Similar trends in all age groups were observed between 2005 and 2006 (Fig. 3A), in particular a substantial drop in April 2006 after the introduction of ITNs. Nevertheless, there are significant age-related differences in some months, e.g. during the peaks before ITN introduction (May and October 2005) and in June-July 2006, where anti-gSG6-P1 IgG levels were significantly higher in older-children and adults (>14

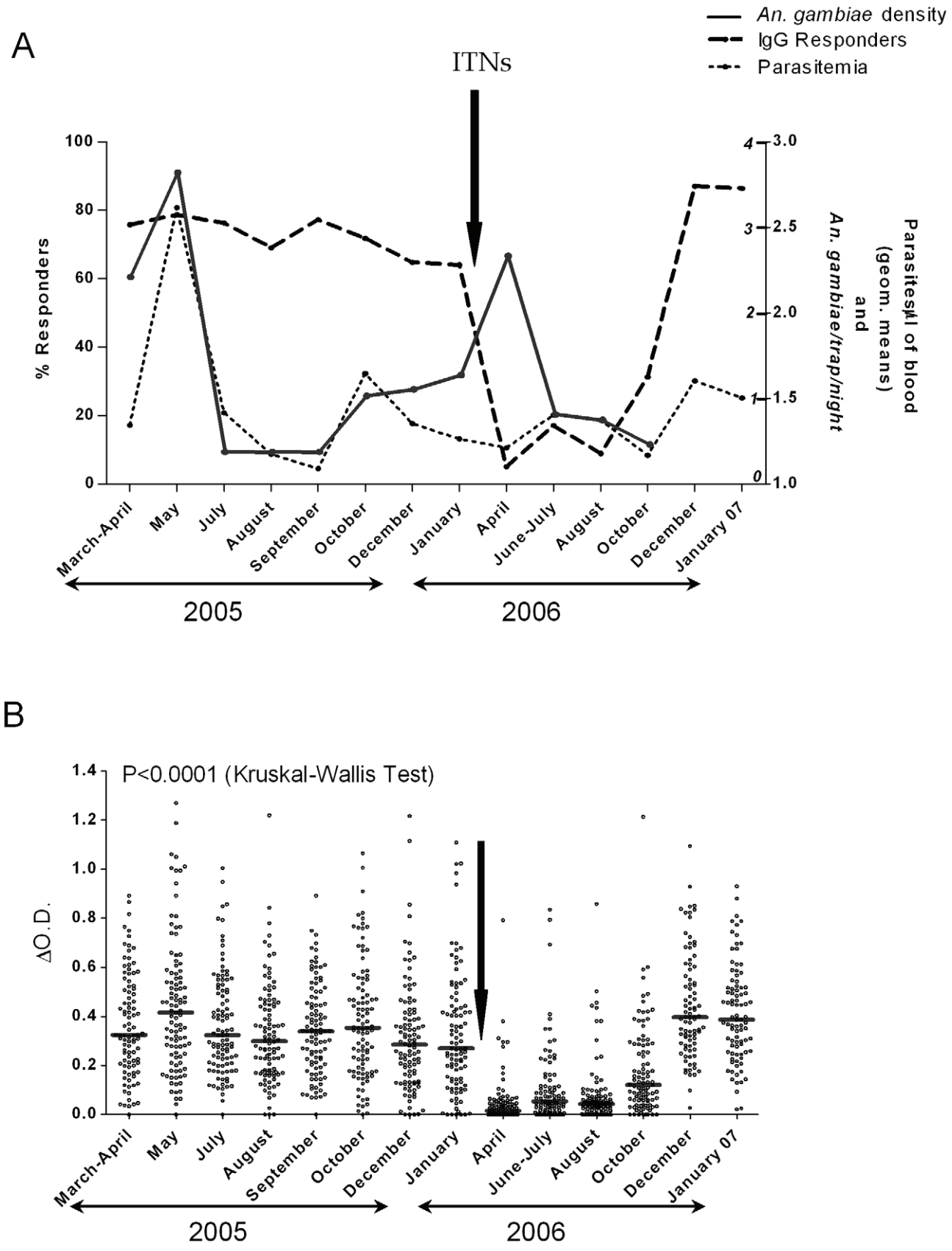


Figure 1. IgG Ab responses to gSG6-P1 before and after ITN use. The percentage (%) of anti-gSG6-P1 IgG immune responders (thick-dotted line) in the "immunological" sub-population (n = 105), before (2005) and after (2006 and January 2007) the installation of ITNs (A). These results are presented together with the intensity of *P. falciparum* infection (mean parasitaemia – fine-dotted line) measured in the same population and the

mean of number of *An. gambiae* (solid line) in the studied area (A). Entomological data (number of *An. gambiae*) were not available in December 2006 and January 2007 (the two last months of the study). This arrow indicates the installation of Insecticide Treated Nets (ITNs) in February 2006. Individual anti-gSG6-P1 IgG levels (ΔOD) are presented before (2005) and after (2006) the installation of ITNs (B). Bars indicate the median value for each studied month. Statistically significant differences between months are indicated.
doi:10.1371/journal.pone.0015596.g001

years) than in younger children. Before ITN installation (2005), seasonal variations were most marked in the >14 years age group.

The relationship between short-term ITN efficacy and anti-gSG6-P1 IgG levels was analysed according to age group (Figure 3 B, C and D). A marked decrease was observed between January and April 2006 in all age groups. In particular, IgG level decreased clearly in all young children from 0–6 years (Fig. 3B) whereas some individuals of 7–14 years (Fig. 3C) and >14 years (Fig. 3D) presented increased or unchanged Ab responses.

Discussion

This study focused on the application of a new biomarker based on evaluation of the human Ab response to an *Anopheles* salivary peptide, as an indicator for evaluating the efficacy of malaria vector control. In this study, a step-by-step approach was adopted to validate the anti-gSG6-P1 IgG response as a biomarker for ITN efficacy from the whole population level to the individual level with a view to identifying a potential tool for evaluation immediately after the introduction of ITNs.

Firstly, the present study and previous data [33] indicated that the correct use of deltamethrin ITNs was followed by a considerable decrease of *P. falciparum* parasitaemia, the current WHO criterion for vector control efficacy [13]. It indicated that ITNs installation was short-term effective in the studied population. In the whole population, the percentage of immune responders and the level of anti-gSG6-P1 IgG Ab in most individuals decreased considerably just after ITNs introduction (April-October 2006). The drop was particularly marked in April-August 2006, corresponding to the peak of *An. gambiae* exposure. Interestingly, the entomological data indicated that this season-dependent peak was similar before (2005) and after (2006) ITN use. This suggests that ITN installation had no impact on *An. gambiae* density, probably because of the low percentage of the overall population covered in the studied area [45]. It indicated also that the drop of anti-gSG6-P1 IgG response was associated with correct ITN use and not due to low *Anopheles* density. As described [37,41], Ab responses to gSG6-P1-peptide could accurately reflect human-vector contact. A marked drop after ITN installation was observed in all age groups studied (<7 years, 7–14 years, and >14 years) suggesting that this biomarker is relevant for ITN evaluation in all age groups. Taken together, these results confirm that - as previously shown with whole *An. gambiae* saliva [33] - the estimation of human Ab responses to *Anopheles* salivary proteins could provide a reliable biomarker for evaluating the efficacy of malaria vector control. It validates the general approach to use Ab to salivary antigens for evaluating the quantitative human exposure to mosquito bites.

The specific gSG6-P1 peptide is more reliable than whole saliva which may show cross-reactivity with salivary epitopes from other arthropods and which could skew and/or overestimated described effects [37]. Interestingly, compared to IgG responses to whole saliva [33], the percentage of responders and the levels of anti-gSG6P1 IgG showed less variability before ITN installation (2005) and especially remained high in January 2006, one month before ITN installation. The use of gSG6-P1 peptide increases the sensitivity and the specificity of such type of biomarker. It strengthens such effective peptide biomarker for the evaluation of ITN efficacy at a large scale. The smallness of seasonal variations could preclude the need for demanding longitudinal evaluation as needed for parasitaemia indicator (full year before introduction and especially during the peak of transmission). One measurement of anti-gSG6-P1 Ab just before ITN installation could provide a representative picture of the specific Ab response, i. e. exposure level to *Anopheles*, prior to ITN introduction.

The gSG6 peptides were designed on the basis of the *An. gambiae s.s.* sequence, the only *Anopheles* genome completely available [46]. In the studied area, the *An. gambiae s.l.* complex, especially *An. gambiae s. s.*, is the main vector of *P. falciparum* as previously described [44]. However other *Anopheles* species, such as *An. arabiensis* and *An. melas*, were locally caught in the study area and had been reported to participate to malaria transmission as

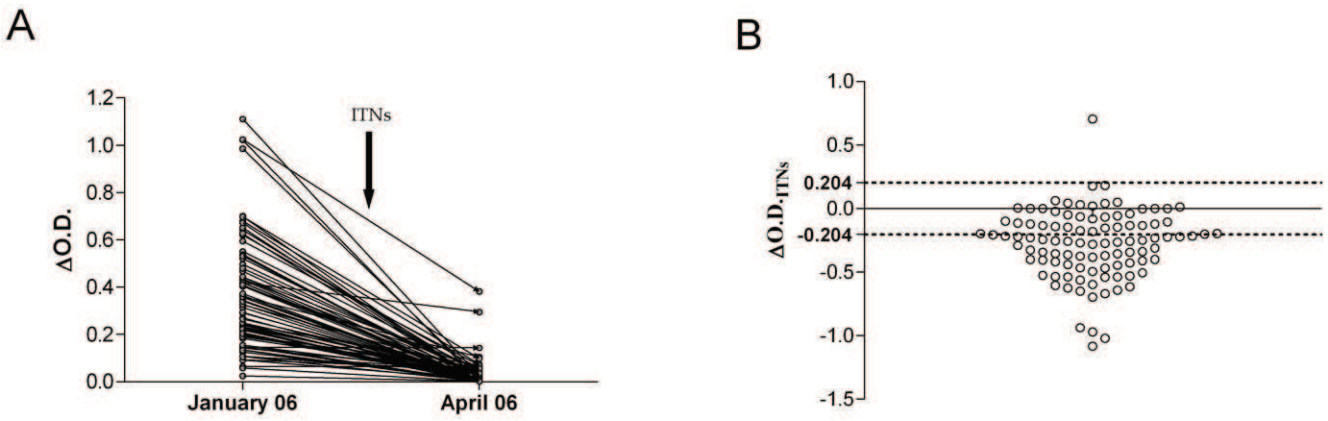


Figure 2. IgG response to gSG6-P1 as biomarker for short-term ITN efficacy. Changes in individual IgG levels (ΔOD) are presented between "just before" (January 2006) and "just after" (April 2006) ITN introduction (n = 105; children and adults) (A). The arrow indicates the installation of Insecticide Treated Nets (ITNs) in February 2006. Individual IgG level changes from January (before) to April are presented (B) by individual ΔOD_{ITNs}, value ($\Delta OD_{ITNs} = \Delta OD_{April06}$ - $\Delta OD_{January06}$). The threshold of specific IgG responders (TR = 0.204) is indicated (dotted line). Significant positive (ΔOD>0.204) or negative (ΔOD<−0.204) changes are therefore individually presented.
doi:10.1371/journal.pone.0015596.g002

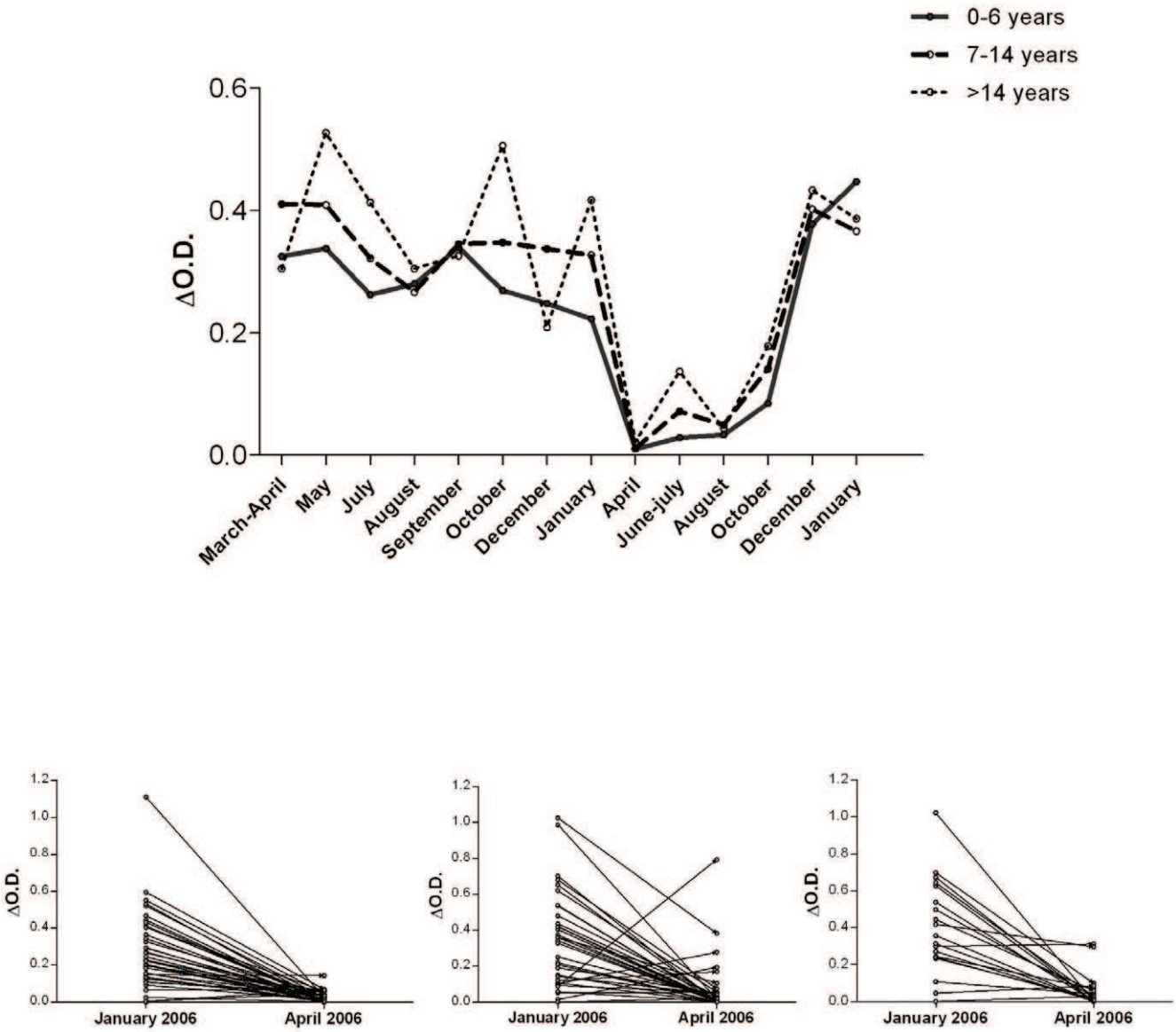


Figure 3. Changes in anti-gSG6-P1 IgG levels before and after the introduction of ITNs according to age group. Median anti-gSG6-P1 IgG levels in 2005–2006 are presented according to three age groups (A): 0–6 years-old (solid line; n = 49), 7–14 years-old (thick-dotted line; n = 34) and >14 years-old (fine-dotted line; n = 25). Individual, short-term changes in specific IgG levels from January (just before) to April (just after ITN installation), are presented according to age group (0–6 years = B; 7–14 years = C and >14 years = D). The arrow indicates the installation of Insecticide Treated Nets (ITNs) in February 2006. Statistically significant differences between age groups are indicated for respective months (*: P<0.05; ***: P<0.0001).
doi:10.1371/journal.pone.0015596.g003

secondary vectors [44]. The exposure of individuals to these "secondary" *Anopheles* species have been probably evaluated using gSG6-P1 peptide which presents a very stable domain of the gSG6 *Anopheles* salivary protein [37] and monoacids sequences highly conserved among *Anopheles* species [40]. For example, it has been shown that gSG6-P1 peptide shares 82% and 91% identity with *An. stephensi* and *An. funestus* [37] and that IgG response to this peptide was also biomarker of *An. funestus* exposure [42]. All these data tends to support the idea that gSG6-P1 can be used to evaluate the exposure to major *Anopheles* species known to be vector of malaria.

After an analysis at the whole population level, an ideal biomarker has to be used i) at the individual level and ii) to evaluate short-term ITN efficacy. The individual results showed that few individuals presented a positive anti-gSG6-P1 IgG response just after ITN installation (from April to August 2006) and that most of these were older children or adults (>14 years). It cannot be ruled out that these older individuals may stay outside the house until late in the evening when *Anopheles* starts biting again so they therefore derive less protection from ITNs than young children who go to sleep earlier in the evening. Individual specific IgG response between January (before) and April 2006 (2 months after ITNs) showed a considerable decrease in all age groups. This rapid decrease after correct ITN usage appears to be a special property of the anti-saliva Ab response which is short-lived in the absence of ongoing antigenic stimulation, at all ages [30,36,47]. The response does not seem to build up but wanes rapidly, when exposure failed. This property represents a major

strength for use such salivary biomarker for evaluating the human exposure to mosquito bites, especially for efficacy of vector control. In addition, using a response threshold ($\Delta OD = 0.204$) combined with ΔOD_{ITNs} - the difference between April (after ITNs) and January 2006 (before) - makes possible the use of this operational biomarker large-scale [40]. If the ΔOD_{ITNs} value is between -0.204 and +0.204, no clear difference can be defined. In contrast, if the individual ΔOD_{ITNs} value <-0.204, it could be concluded with a high level of confidence that this individual is benefiting from ITN installation. The ΔOD_{ITNs} parameter could therefore provide a measure of ITN efficacy at the individual level. An individual biomarker would also be relevant at the large-scale, operational level in the field, e.g. in National Malaria Control Programs (NMCP), since it is pertinent for the evaluation of short-term ITN efficacy, as demonstrated in the study (April, 2 months after ITN installation). Short-term and individual changes in Ab responses to gSG6-P1 provide a superior biomarker to *P. falciparum* parasitaemia, especially in a context of low malaria transmission and by evaluation of ITN efficacy, only in small sub-sample (around $N = 100$) from populations receiving ITN (parasitaemia needing a larger population of the order of $N = 1000$). We have previously shown the high sensitivity and specificity of the gSG6-P1 Ab response make it ideal for the evaluation of low-level exposure to *An. gambiae* [41] which is relevant in areas where exposure/transmission is being curtailed by NMCP efforts. In addition, its evaluation can be performed from blood spots on filter paper, which is easy and operational to be integrated in NMCP strategies.

The ITN survey, as previously reported in the studied area [33], indicated that only 53% of ITNs were being correctly used and were undamaged after just 4–5 months of use (June/July 2006), as also observed in several other endemic areas [14]. Because of the high sensitivity of gSG6-P1, we were able to observe an increase in specific IgG levels from October 2006 (8 months after ITN installation). The strong decrease of anti-gSG6-P1 IgG response was therefore transient after ITN installation and the biomarker reappeared as correct ITN usage waned and individuals were once re-exposed to *An. gambiae*. These results point up the relevance of this salivary biomarker for the evaluation of short-term efficacy as well as longer-term monitoring.

The results suggest that this salivary biomarker for *Anopheles* exposure could constitute an efficient, reliable and new tool for evaluating the efficacy of malaria vector control, at both population and individual levels. Further studies are however needed to confirm this in other areas and for different vector control strategies. Finally, this first approach could be similarly applied to vector-control strategies for other mosquito-borne diseases such as emergent arbovirus diseases.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the population of Bella Vista area (Lobito, Angola) for their participation in this study; all the technical personal of the MCP team, especially Maria Chilombo (SONAMET Lobito); and Cheikh Sow, Amady Ndiaye and Souleymane Doucoure from the IRD-EPIVECT group, for their technical support. We gratefully acknowledge Dr Jean-François Foucher ACERGY Company) for his helpful contribution, Dr Karine Puget (Genepep SA) for helpful advices on peptide synthesize and Dr Anthony Molloy for the English review of the manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PMD AP PB FS PC FR. Performed the experiments: PMD AP JCT VF MD. Analyzed the data: PMD PB VF PC FR. Contributed reagents/materials/analysis tools: PMD AP PB SC JM JCT VF MD MS PC FR. Wrote the paper: PMD AP SC MS FS FF PC FR. Logistical help in the field: FF PB JCT.

References

1. Hay SI, Okiro EA, Gething PW, Patil AP, Tatem AJ, et al. (2010) Estimating the global clinical burden of Plasmodium falciparum Malaria in 2007. PLoS Med 7: e1000290.
2. WHO (2008) World Malaria Report. World Health Organization. Available in: http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241563697/en/index.html.
3. Hawley WA, Phillips-Howard PA, ter Kuile FO, Terlouw DJ, Vulule JM, et al. (2003) Community-wide effects of permethrin-treated bed nets on child mortality and malaria morbidity in western Kenya. Am J Trop Med Hyg 68: 121–127.
4. Maxwell CA, Msuya E, Sudi M, Njunwa KJ, Carneiro IA, et al. (2002) Effect of community-wide use of insecticide-treated nets for 3-4 years on malarial morbidity in Tanzania. Trop Med Int Health 7: 1003–1008.
5. Takken W, Knols BG (2009) Malaria vector control: current and future strategies. Trends Parasitol 25: 101–104.
6. Nevill CG, Some ES, Mung'ala VO, Mutemi W, New L, et al. (1996) Insecticide-treated bednets reduce mortality and severe morbidity from malaria among children on the Kenyan coast. Trop Med Int Health 1: 139–146.
7. Killeen GF, Smith TA, Ferguson HM, Mshinda H, Abdulla S, et al. (2007) Preventing childhood malaria in Africa by protecting adults from mosquitoes with insecticide-treated nets. PLoS Med 4: e229.
8. Binka FN, Kubaje A, Adjuik M, Williams LA, Lengeler C, et al. (1996) Impact of permethrin impregnated bednets on child mortality in Kassena-Nankana district, Ghana: a randomized controlled trial. Trop Med Int Health 1: 147–154.
9. Binka FN, Indome F, Smith T (1998) Impact of spatial distribution of permethrin-impregnated bed nets on child mortality in rural northern Ghana. Am J Trop Med Hyg 59: 80–85.
10. Yukich JO, Lengeler C, Tediosi F, Brown N, Mulligan JA, et al. (2008) Costs and consequences of large-scale vector control for malaria. Malar J 7: 258.
11. Chouaibou M, Simard F, Chandre F, Etang J, Darriet F, et al. (2006) Efficacy of bifenthrin-impregnated bednets against Anopheles funestus and pyrethroid-resistant Anopheles gambiae in North Cameroon. Malar J 5: 77.
12. Lengeler C (2004) Insecticide-treated bed nets and curtains for preventing malaria. Cochrane Database Syst Rev. pp CD000363.
13. Smith T, Killeen G, Lengeler C, Tanner M (2004) Relationships between the outcome of Plasmodium falciparum infection and the intensity of transmission in Africa. Am J Trop Med Hyg 71: 80–86.
14. Noor AM, Moloney G, Borle M, Fegan GW, Shewchuk T, et al. (2008) The use of mosquito nets and the prevalence of Plasmodium falciparum infection in rural South Central Somalia. PLoS One 3: e2081.
15. Billingsley PF, Baird J, Mitchell JA, Drakeley C (2006) Immune interactions between mosquitoes and their hosts. Parasite Immunol 28: 143–153.
16. Remoue F, Cornelie S, Ngom A, Boulanger D, Simondon F (2005) Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. In Update in tropical immunology Edited by: Garraud O Fort PO Trivandrum, Herala India: Transworld research Network. pp 377–400.
17. Ribeiro JM (1987) Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annu Rev Entomol 32: 463–478.
18. Ribeiro JM, Francischetti IM (2003) Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. Annu Rev Entomol 48: 73–88.
19. Ribeiro JM, Makoul GT, Levine J, Robinson DR, Spielman A (1985) Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, Ixodes dammini. J Exp Med 161: 332–344.
20. Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN, Teixeira AR (2001) Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. Am J Trop Med Hyg 65: 219–226.
21. Lane RS, Moss RB, Hsu YP, Wei T, Mesirow ML, et al. (1999) Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. Am J Trop Med Hyg 61: 850–859.
22. Schwartz BS, Ribeiro JM, Goldstein MD (1990) Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. Am J Epidemiol 132: 58–66.
23. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, et al. (2000) Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? Am J Trop Med Hyg 62: 740–745.
24. Rohousova I, Ozensoy S, Ozbel Y, Volf P (2005) Detection of species-specific antibody response of humans and mice bitten by sand flies. Parasitology 130: 493–499.
25. Poinsignon A, Remoue F, Rossignol M, Cornelie S, Courtin D, et al. (2008) Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. Am J Trop Med Hyg 78: 750–753.
26. Das MK, Mishra A, Beuria MK, Dash AP (1991) Human natural antibodies to Culex quinquefasciatus: age-dependent occurrence. J Am Mosq Control Assoc 7: 319–321.

27. Peng Z, Rasic N, Liu Y, Simons FE (2002) Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors. J Allergy Clin Immunol 110: 816–817.
28. Remoue F, Alix E, Cornelie S, Sokhna C, Cisse B, et al. (2007) IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. Acta Trop 104: 108–115.
29. Reunala T, Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Miyanij M, Ruiz-Maldonado R, et al. (1994) Frequent occurrence of IgE and IgG4 antibodies against saliva of Aedes communis and Aedes aegypti mosquitoes in children. Int Arch Allergy Immunol 104: 366–371.
30. Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve JP, et al. (2006) Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 100: 363–370.
31. Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L, et al. (2006) Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand. Acta Trop 98: 66–73.
32. Andrade BB, Rocha BC, Reis-Filho A, Camargo LM, Tadei WP, et al. (2009) Anti-Anopheles darlingi saliva antibodies as marker of Plasmodium vivax infection and clinical immunity in the Brazilian Amazon. Malar J 8: 121.
33. Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Le Mire J, Dos-Santos MA, et al. (2010) Human antibody response to Anopheles gambiae saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. Am J Trop Med Hyg 83: 115–121.
34. Lombardo F, Ronca R, Rizzo C, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, et al. (2009) The Anopheles gambiae salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role. Insect Biochem Mol Biol 39: 457–466.
35. Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM (2003) Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the Anopheles stephensi mosquito. Insect Biochem Mol Biol 33: 717–732.
36. Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoue F, et al. (2007) Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa. Microbes Infect 9: 1454–1462.
37. Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, et al. (2008) Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. PLoS One 3: e2472.
38. Arca B, Lombardo F, de Lara Capurro M, della Torre A, Dimopoulos G, et al. (1999) Trapping cDNAs encoding secreted proteins from the salivary glands of the malaria vector Anopheles gambiae. Proc Natl Acad Sci U S A 96: 1516–1521.
39. Calvo E, Andersen J, Francischetti IM, de LCM, deBianchi AG, et al. (2004) The transcriptome of adult female Anopheles darlingi salivary glands. Insect Mol Biol 13: 73–88.
40. Calvo E, Dao A, Pham VM, Ribeiro JM (2007) An insight into the sialome of Anopheles funestus reveals an emerging pattern in anopheline salivary protein families. Insect Biochem Mol Biol 37: 164–175.
41. Poinsignon A, Cornelie S, Ba F, Boulanger D, Sow C, et al. (2009) Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites. Malar J 8: 198.
42. Poinsignon A, Samb B, Doucoure S, Drame PM, Sarr JB, et al. (2010) A First attempt to validate the gSG6-P1 salivary peptide as an imuno-epidemiological tool for evaluating human exposure to An.funestus bites. Trop Med Int Health In press.
43. Calzetta M, Santolamazza F, Carrara GC, Cani PJ, Fortes F, et al. (2008) Distribution and chromosomal characterization of the Anopheles gambiae complex in Angola. Am J Trop Med Hyg 78: 169–175.
44. Cuamba N, Choi KS, Townson H (2006) Malaria vectors in Angola: distribution of species and molecular forms of the Anopheles gambiae complex, their pyrethroid insecticide knockdown resistance (kdr) status and Plasmodium falciparum sporozoite rates. Malar J 5: 2.
45. Corran P, Coleman P, Riley E, Drakeley C (2007) Serology: a robust indicator of malaria transmission intensity? Trends Parasitol 23: 575–582.
46. Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, et al. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito Anopheles gambiae. Science 298: 129–149.
47. Cornelie S, Remoue F, Doucoure S, Ndiaye T, Sauvage FX, et al. (2007) An insight into immunogenic salivary proteins of Anopheles gambiae in African children. Malar J 6: 75.

Human IgG responses to a salivary peptide, gSG6-P1: an immuno-epidemiological tool for evaluating the exposure heterogeneity to *Anopheles* bites in Dakar region, Senegal.

Drame PM, Machault V, Diallo A, Poinsignon A, Ndecky A, Cornelie S, Doucoure S, Dos-Santos S, Lalou R, Sembene M , Hesran J-Y, Pages F and Remoue F.

Background:

Globally, almost 1 billion people lived, in 2007, under unstable, or extremely low, malaria risk areas [1]. This mainly corresponds to seasonal transmission, or highlands (> 1,500 m), arid/semi-arid and urban areas. In particular, malaria is now becoming a serious public health problem in the urban settings, especially in several rapidly growing African cities because of migration of human population from the countryside [2, 3]. In 2003, 39% of 850 million Africans were living in urban areas, and this is projected to increase to 54% by 2030 [4]. Until recently, urban development was generally believed to reduce the risk of vector breeding, and thus malaria transmission [5] However, many African countries have declining economies, and most cities are struggling to cope with the pace and the extent of urbanization [5]. Poor housing and lack of sanitation and drainage of surface water can increase vector breeding and human vector contact, and thus pose unique challenges for control [6, 7]. Furthermore, the adaptation of malaria vectors to urban areas has been well documented for at least two decades [8], and local transmission has been reported in many African cities [9]. In addition people in these settings could be, in spite their low exposure level to *Anopheles* vectors' bites, at a high risk of malarial morbidity and mortality due to delayed acquisition or lack of protective immunity (protective immunity is acquired so slowly in these urban settings) [9]. The epidemiology of malaria in cities is, then, specific, and the urban form of the disease is considered to be an emerging health problem of major importance in Africa [10].

In Dakar areas, typical example of these sub-Saharan African sprawling cities, malaria transmission has been studied for several decades. *Anopheles arabiensis* (*An. gambiae s.l.*) is the most abundant and the main vector which ensured *Plasmodium falciparum* transmission [11, 12, 13]. Malaria risk and transmission in Dakar region are highly focal [14, 15], at scales of a few hundred metres, due to diversity in the degree and type of urbanization, density of human population, quality of water and waste management, vector control measures, household factors and access to health care [12, 14, 15]. Results from studies [11, 12, 13, 14, 15, 16] underline possible changes in the human exposure to *Anopheles* bites and malaria transmission

situations in this region. A recent study has reported that, in proportion to the total population of the city, the population at high risk for malaria fell from 32% to 20%, whereas the low-risk population rose from 29 to 41% [15]. All this suggest currently the need for a larger and precise evaluation of malaria risk.

Nowadays, strategies for malaria risk surveillance and control are limited efficiency in these epidemiological urban settings. Indeed, entomological (the entomological inoculation rate [EIR]) and parasitological methods (*Plasmodium* density in human blood), the referent tools to assess the risk of malaria, are limited in a context of urban transmission (low transmission generally). Parasitological methods need large-scale field evaluation and a substantial threshold of detection of parasites in blood. The evaluation of *Anopheles* density using entomological methods (traps, household/indoor sprayings, human-landing catches, etc.), the first step in an EIR assessment, is not sensitive enough to permit estimation of low-level exposure to *Anopheles*: the total number of *Anopheles* collected is too low to estimate real exposure and thus the risk of malaria transmission. In addition, such methods are mainly applicable at the population level and do not enable the evaluation of the heterogeneity of individual exposure. A simple, rapid, highly sensitive tool is, therefore, needed to evaluate exposure to *Anopheles* bites and the risk of malaria in urban areas.

It has been proposed that the level of exposure to vector bites could be evaluated by measuring the antibody (Ab) response to arthropod saliva in exposed populations [17, 18]. The salivary proteins of haematophagous facilitate blood-feeding by counteracting human defence mechanisms (inflammation and blood clotting) and modulating the human host's immune response [19, 20]. Some of these salivary proteins are immunogenic and induce a specific Ab response [21] which could be applied as a marker of exposure to vector-borne diseases in individuals bitten by arthropod vectors, e.g. ticks [22], sandflies [23], *Triatoma* [24], *Glossina* [25], *Aedes* [26, 27] and *Anopheles* [28, 29, 30].

Recently, the *Anopheles* genus specific [31, 32] and antigenic [33] salivary protein SG6 has been identified as an encouraging candidate as serological marker of exposure. By a step-by-step approach, coupling bio-informatic and immuno-epidemiological approaches, the gSG6-P1 peptide (derived from the *Anopheles gambiae s.s.* SG6 protein) was defined and validated as a potential immuno-epidemiological marker specific to *Anopheles* exposure [34], especially in low and very low *Anopheles* bites exposure contexts [35]. The aim of this work was to evaluate the use of the gSG6-P1 biomarker in measuring the heterogeneity of malaria risks in children and women (adults) living in an endemic urban area of sub-Saharan Africa where, in general, levels of exposure to *Anopheles* bites are low and very heterogeneous.

Material and Methods

Study site

Dakar (the capital city of Senegal) region (14° 43' 29.06" North, 17° 28' 24.06" West) is located in the Cap-Vert peninsula at the westernmost point of Africa. In 2008, the estimated population was 2,482,294 inhabitants, amounting to about 21% of the country's population (11,841,138 inhabitants), with density of 4459 inhab/km^2. Dakar region is a globally coastal plain area; the maximum altitude peaks at 104 m above sea level (Mamelles). The study concerned different areas within the four departments of Dakar's region: the downtown of Dakar, Pikine, Guediawaye and Rufisque and it has been conducted from the end of July 2008 to the end of December 2008.

The Cap-Vert peninsula has a mild sahelian climate. The hot and wet season lasts from June to November, with average temperatures between 24 and 30°C; the cool and dry season lasts from December to May, with average temperatures between 19 and 25°C. The first rains occur generally at the end of June or the beginning of July, and the last ones at the beginning of October. In 2008, the annual average of rainfalls was 510 mm with a maximum in August and September (data from the Senegalese National Meteorological Services, http://www.meteo-senegal.net/). *Plasmodium* species (mainly *P. falciparum*) transmission (July to December) by *Anopheles gambiae* complex (mainly *An. arabiensis*) is low and seasonally with a peak from September to November.

Selection of sites and study population

Dakar region is divided in urban districts (UD; 42 in total) which are constituted by census districts (CD; 2000 approximately) which counts each at least 1,000 inhabitants and are the finest level in terms of demographic inventory in Senegal. The first step of this work was to map individual and household information stemming from the general inventory of the Senegalese's population and habitat of 2002 (individual socio-cultural and demographic characteristics, households' economic levels…). An analysis of the main socio-demographic and economic variables of individuals and households, using the k-means' statistical method, was performed and allowed to classify the CD in five types. One of the most representative CD type (the majority type) of each UD was randomly selected. Forty-two CD were then obtained. The program having planed fifty sites for the study, therefore eight other CD were chosen according their socio-demographic and economic characteristics and proximity to shallows in order to consider the "district effect" and their distance between other selected CD. Selected census districts were visited by one of the five investigators' teams who

identified 60 households within each (3000 households for the 50 sites). In view of the fact that an updated list of households was not available, households were chosen according to itineraries pre-established by supervisor of investigators' teams. The first criteria of selection were the presence of a 2-10 years-old child. After having family agreement, a socio-demographic investigator crossed a complete questionnaire about the household's lifestyle, income, the access mode to healthcare facilities. And the adult woman (generally the child mother) who answered the questionnaire was selected concomitantly. Five engaged nurses passed then for thick blood smear and dried blood spot (on filter paper) samplings of selected woman and child in each household. Pregnant women, individuals who were sick and have taken anti-malarial drugs during the last 15-30 days having preceded nurses' passage were excluded.

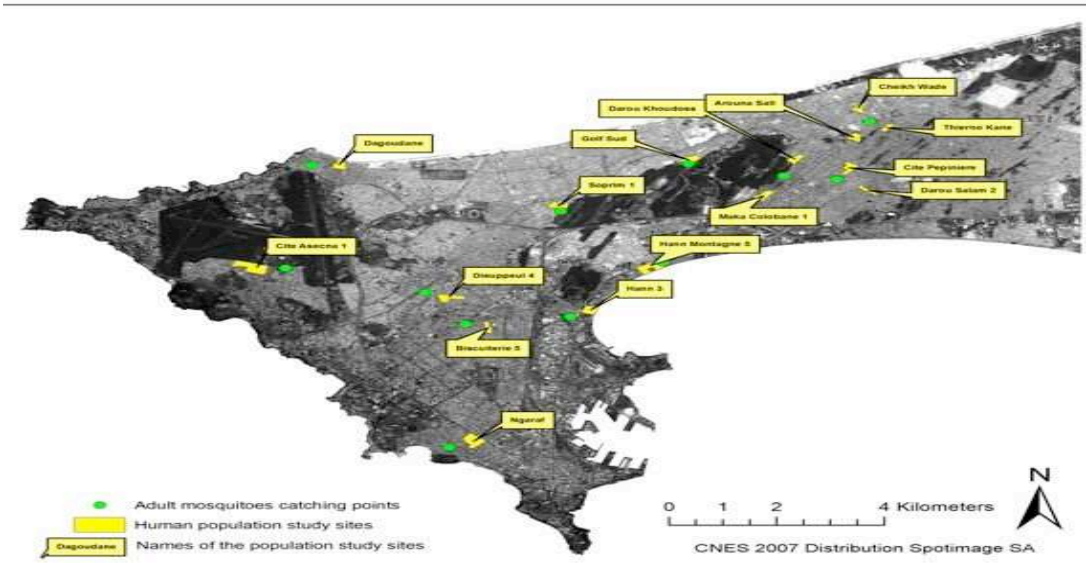


Figure 1: Localization the studied sites
The 12 adult mosquitoes caching (in green) and the 16 blood spots sampling (in yellow) sites are localised on this map. Sometimes an adult mosquitoes catching point can serve to estimate *An. gambiae* intensity of exposure in 2 or 3 neighbouring blood spots sampling sites.

In total 6,000 individuals (3,000 children and 3,000 women) of 50 sites of Dakar's region were sampled, from the beginning of October to the end of December 2008, for thick blood smear (for prevalence and density of malaria parasites evaluation) and dried blood spot for the

study of the anti-gSG6-P1 (*Anopheles* specific salivary synthetic peptide) IgG response in order to evaluate exposure levels to *Anopheles* bites (ELISA) in this study. We present here only the results of anti-gSG6-P1 peptide IgG response of 2,020 (1,010 children 2-10 years and 1,010 women >18 years (adults)) randomly selected individuals within 16 sites (CD) where entomological surveys were performed from July 2008 (the beginning of the rainy season) to the date of blood spots samplings (October to December 2008 according areas) (figure 1). The entomological surveys and blood spots on blotting paper sampling dates are presented in the table 1.

Table 1: Entomological surveys and blood spots on blotting paper samplings dates

Districts' name	Blood sampling dates	1st-day mosquitoes sampling	Last-day mosquitoes sampling	Number of sampling nights*
Ngaraf (Medina)	27-Dec-08	8-Aug-08	19-Dec-08	10
Biscuiterie (Grand-Dakar)	29-Nov to 2-Dec-08	5-Aug-08	26-Nov-08	9
Hann Montagne	4 to 9-Oct-08	29-Jul-08	6-Oct-08	6
Hann 3	11 to 16-Oct-08	29-Jul-08	6-Oct-08	6
Dieupeul 4	1 to 9-Nov-08	6-Aug-08	29-Oct-08	7
Cité ASECNA 1	4 to 11-Oct-08	5-Aug-08	6-Oct-08	5
Yoff Dagoudane	10 to 13-Nov-08	5-Aug-08	10-Nov-08	8
Cite SOPRIM	25 to 30-Oct-08	30-Jul-08	22-Oct-08	7
Golf Sud	22 to 27-Nov-08	2-Aug-08	21-Nov-08	9
Cheikh Wade (Guédiawaye)	20 to 26-Nov-08	11-Aug-08	17-Nov-08	8
Arouna Sall (Guédiawaye)	22 to 23-Nov-08	11-Aug-08	1-Dec-08	9
Thierno Kane (Guédiawaye)	20 to 22-Nov-08	11-Aug-08	17-Nov-08	8
Maka Colobane (Pikine)	8 to 13-Nov-08	29-Jul-08	3-Nov-08	8
Cité Pépinière (Pikine)	15 to 20-Nov-08	29-Jul-08	17-Nov-08	9
Darou Khoudoss (Pikine)	23 to 27-Nov-08	29-Jul-08	17-Nov-08	9
Darou Salam 2 (Pikine)	8 to 13-Nov-08	29-Jul-08	3-Nov-08	8

The last-day mosquitoes sampling and the number of sampling night are reported for each district from the 1st sampling day (during the beginning of the transmission period) to the beginning blood spots samplings in the concerning district.

Adult mosquito field sampling and analysis

Adult mosquito sampling was carried out once every two weeks during the study period in. 12 study sites located in Dakar and its closed suburbs, Pikine and Guédiawaye Human landing catches of adult mosquitoes were conducted both indoor (1 catching point) and outdoor (2 catching points) in each of the study areas. Six to ten study nights were carried out in each area. Indoor captures were conducted with the window or door slightly ajar. Collectors gave

prior informed consent and received yellow fever immunisations and antimalarial chemoprophylaxis consisting of 100 mg doxycycline per day for the duration of the study and one month thereafter. Two collectors were contracted for each catching point to work from 8:00 p.m. to 7:00 a.m., with each one resting every two hours. Collectors were rotated among the catching points on different collection nights to minimise sampling bias.

The mosquitoes were recorded by catching point, date and hour of capture and they were sorted by genera. The anopheline mosquitoes were identified morphologically following the Gillies and Coetzee keys [36].

The human biting rate (HBR), also termed aggressiveness, was expressed as the number of female *An. gambiae s.l.* per person per night, averaged for both outdoor and indoor catching points. Thus, the aggressiveness reported in this study for each district accounted for the average cumulative bites per person per night received before the blood sampling.

Salivary peptide gSG6-P1

The gSG6-P1 peptide was designed using bioinformatics to maximize its *Anopheles* specificity and its antigenicity, as previously described (Anne plos). The gSG6-P1 peptide was synthesized, purified (> 95%) by Genepep SA (St-Clément de Rivière, France). All peptides were shipped in lyophilized form and then suspended in 0.22 µm ultra-filtered water and frozen in aliquots at -80°C until use for immunological tests (ELISA).

Evaluation of human IgG antibody levels (ELISA)

Standardized dried blood spots (80 mm diameter) were eluted by incubation in 300 µl of phosphate buffered saline (PBS–Tween-0.1%) at 4°C for 24 hours [37]. ELISAs were carried out on eluates to assay IgG to the gSG6-P1 antigen. Maxisorp plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gSG6-P1 (20 µg/mL) in PBS. Each eluate was then incubated (duplicate) at 4 °C overnight at a 1/20 dilution (PBS–Tween-1%). This optimal dilution had been determined in preliminary experiments. Mouse biotinylated Ab against human IgG (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) was incubated at a 1/2000 dilution and peroxidase-conjugated streptavidin (Amersham, Les Ulis, France) was then added (1/2000) Colorimetric development was carried out using ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) diammonium; Sigma, St Louis, MO) in 50 mM citrate buffer (pH 4) containing 0.003% H_2O_2. Optical Density (OD) was measured at 405 nm. In parallel, each test sample was assessed in a blank well containing no gSG6-P1 antigen (ODn) to measure non-specific reactions. Individual results were expressed as the ΔOD value: ΔOD = ODx-ODn, where

ODx represents the mean of individual OD in both antigen wells. Specific anti-gSG6-P1 IgG levels were also assayed in non-*Anopheles* exposed individuals (n = 14 – neg; North of France) in order to quantify the non-specific background Ab level and to calculate the specific immune response threshold (TR): TR = mean (ΔDO_{neg}) + 3SD = 0.204, i.e. an exposed individual was classified as a responder if its $\Delta OD > 0.204$.

Statistical analysis:

All data were analyzed with GraphPad Prism5 software® (San Diego,CA, USA). After verifying that values did not assume Gaussian distribution, the non-parametric Mann-Whitney U-test was used for comparison of Ab levels between two independent groups, the Wilcoxon matched pairs test for comparison of medians of two paired groups, the non-parametric Kruskal-Wallis test for comparison of medians (the ANOVA simple test for comparison of means) of more than two groups and the Fischer exact test for comparison between two proportions. The non-parametric Spearman simple linear correlation test was used to evaluate association level between IgG median responses and exposure levels to *An. gambiae* bites. All differences were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Specific individual IgG responses to the gSG6-P1 peptide according to the census districts

Individual IgG Ab levels specific to gSG6-P1 peptide were evaluated according to studied sites (CD). The number of individuals (children and women) in whom IgG Ab responses were evaluated varies from 56 (in Ngaraf-Medina) to 76 (in Hann Montagne). In spite of intra-district individual variations, the median-levels of IgG Ab responses against gSG6-P1 differed significantly ($P < 0.0001$; non-parametric Kruskal-Wallis test) between sites (Figure 2). Indeed IgG Ab median response was higher in Hann Montagne (a suburb of Dakar Department; median $\Delta OD = 0.350$), Golf Sud (Guédiawaye Department; $\Delta OD = 0.350$), Maka Colobane (Pikine Department; $\Delta OD = 0.323$) and Cité ASECNA 1 (a suburb district of Dakar Department; $\Delta OD = 0.328$) and lower in Arouna Sall (Guédiawaye Department; $\Delta OD = 0.189$), in Biscuiterie and Ngaraf (2 popular districts of Dakar Department; median $\Delta OD = 0.209$ and 0.234 respectively) and in Darou Salam 2 (Pikine Department; $\Delta OD = 0.214$).

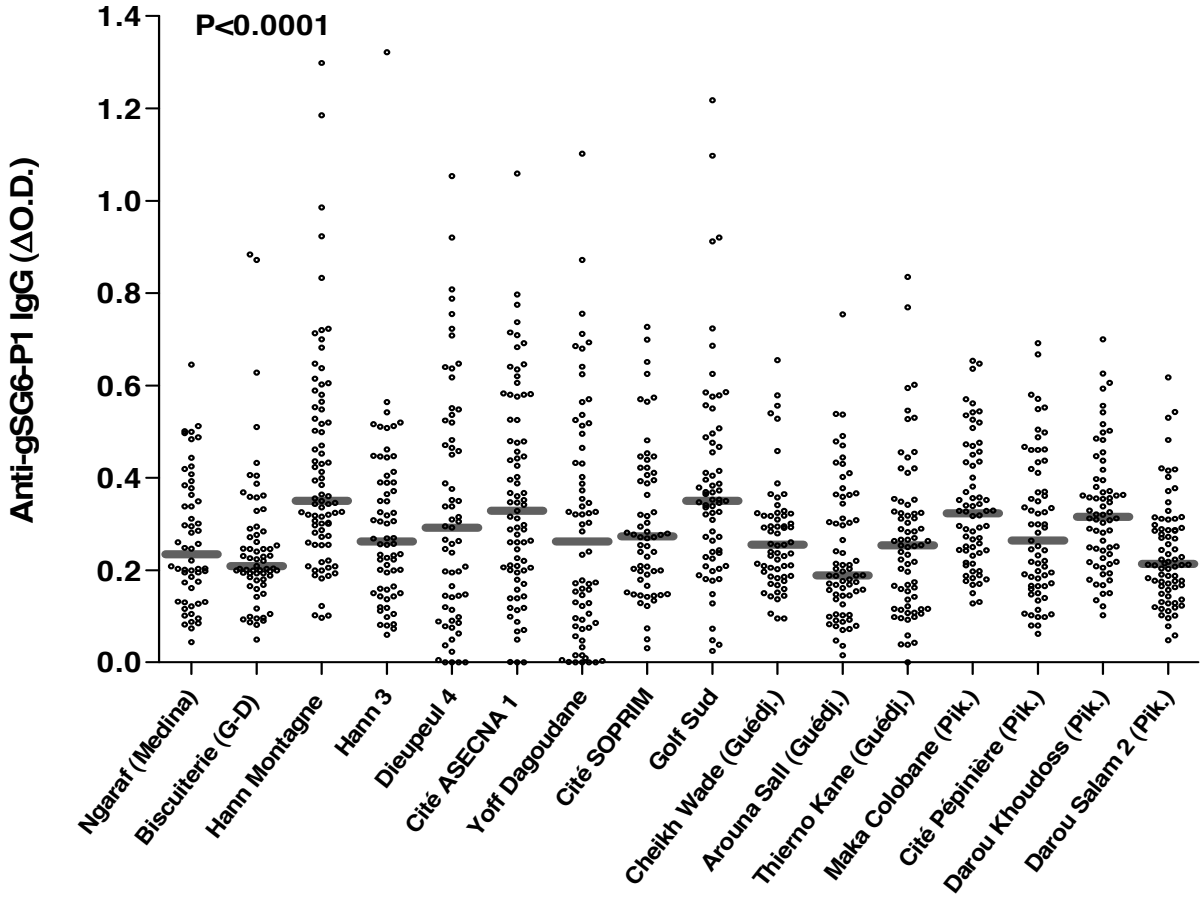


Figure 2: Individual IgG antibody levels to specific gSG6 peptide1 in the studied sites.
Individual specific gSG6-P1 peptide IgG response (ΔOD) results are presented and bars indicate the median value for randomly selected individuals in each district. Statistical significant differences between levels of exposure are indicated (P<0.0001; non-parametric Kruskal-Wallis test)

Percentages of individual IgG Ab responders (% IR) to gSG6-P1 peptide

The percentage of responders (individuals with ΔOD> 0.204= TR, the threshold of responder) to gSG6-P1 peptide was calculated for studied total population of each district. Proportions of women and children responders of each site were also compared (Table 2). Results show that percentages of responders in the total population were fairly high in all districts (minimum: 43.55% in Arouna Sall and maximum: 86.84 in Hann Montagne) and varied considerably between them. Indeed, % IR was lower in Arouna Sall (43.55 %), Ngaraf-Medina (50.00 %), Biscuiterie (50.00 %), Darou Salam 2 (54.29 %) and Yoff Dagoudane (54.84 %) and higher in Cité ASECNA 1 (74.29 %), Golf Sud (81.25 %), Darou Khoudoss (82.76 %), Maka Colobane (83.33 %) and Hann Montagne (86.84 %), as median-levels of IgG Ab responses. Significant difference between % IR in children and in women was observed only in Cité SOPRIM (a suburb district of Dakar Department), even if the global tendency, in all districts, was a higher percentage of % IR in women compared to children of the same district (Table 2). Indeed, in

this district, % IR of anti-gSG6-P1 IgG responders in children is significantly lower than in women (P= 0.01) contrary to the results obtained with median-levels of individual IgG Ab responses (P= 0.25; Wilcoxon matched pairs test, data not shown).

Table 2: Responders in anti-gSG6-P1 peptide IgG and age mean of children and women of each studied district.

Districts' name	All individuals		Children (0-10 years-old)			Women (>18 years-old)			P*
	n	**Resp. (%)**	**n**	**M. age (IC)**	**Resp. (%)**	**n**	**M. age (IC)**	**Resp. (%)**	
Arouna Sall (Guédiawaye)	62	27 (43.55)	31	5.0 (3.9 - 6.1)	12 (38.71)	31	33.2 (30.0 - 36.4)	15 (48.39)	0.61
Ngaraf (Medina)	56	28 (50.00)	28	5.6 (4.6 - 6.6)	10 (35.71)	28	39.9 (34.7 - 45.0)	18 (64.29)	0.06
Biscuiterie (Grand-Dakar)	60	30 (50.00)	30	6.2 (5.1 - 7.2)	12 (40.00)	30	36.2 (30.6 - 41.8)	18 (60.00)	0.20
Darou Salam 2 (Pikine)	70	38 (54.29)	35	4.5 (3.6 - 5.6)	19 (54.29)	35	31.5 (27.9 - 35.1)	19 (54.29)	1.00
Yoff Dagoudane	62	34 (54.84)	31	5.1 (4.1 - 6.0)	15 (48.39)	31	40.7 (36.6 - 44.7)	19 (61.29)	0.44
Cité Pépinière (Pikine)	62	37 (59.68)	31	6.4 (5.4 - 7.3)	18 (58.06)	31	43.0 (37.7 - 48.4)	19 (61.29)	1.00
Thierno Kane (Guédiawaye)	70	43 (61.43)	35	5.7 (4.8 - 6.5)	19 (54.29)	35	34.8 (30.6 - 39.0)	24 (68.57)	0.33
Dieupeul 4	58	36 (62.07)	29	6.3 (5.1 - 7.4)	19 (65.62)	29	38.8 (33.7 - 43.8)	17 (58.62)	0.79
Hann 3	64	41 (64.06)	32	5.1 (4.2 - 5.9)	20 (62.50)	32	33.4 (30.1 - 36.7)	21 (65.63)	1.00
Cite SOPRIM	**58**	**38 (65.52)**	**29**	**5.9 (4.1 - 6.0)**	**14 (48.28)**	**29**	**38.1 (34.4 - 41.7)**	**24 (82.76)**	**0.01**
Cheikh Wade (Guédiawaye)	60	42 (70.00)	30	4.9 (3.9 - 5.8)	22 (73.33)	30	32.7 (29.4 - 36.0)	20 (66.67)	0.78
Cite Asecna	70	52 (74.29)	35	5.0 (4.2 - 5.7)	24 (68.57)	35	36.8 (32.9 - 40.8)	28 (80.00)	0.41
Golf Sud	64	52 (81.25)	32	5.3 (4.3 - 6.2)	24 (75.00)	32	36.8 (33.4 - 40.2)	28 (87.50)	0.34
Darou Khoudoss (Pikine)	58	48 (82.76)	29	4.8 (4.0 - 5.6)	23 (79.31)	29	32.7 (29.6 - 35.8)	25 (86.21)	0.73
Maka Colobane (Pikine)	60	50 (83.33)	30	6.5 (5.5 - 7.5)	26 (86.67)	30	39.35 (35.4 - 43.3)	24 (80.00)	0.73
Hann Montagne	76	66 (86.84)	38	5.6 (4.8 - 6.4)	33 (86.84)	38	34.1 (30.5 - 37.8)	33 (86.84)	1.00

n represents the number of randomly selected individuals (adults and children), children or women in each studied site. P*: p-value obtained by comparing the proportion of anti-gSG6-P1 IgG responders (Resp.) between children and women of the same district by Fischer exact test. IC: 95 % Interval of Confidence of the groups' age mean (M. age).

Results in Table 2 show also that the mean of age of children in all districts was 5.5 years-old. It varied between 4.5 (in Darou Salam 2) to 6.5 years-old (in Maka Colobane), without significant differences between districts (confidence intervals of pairs of ages' mean didn't overlap), suggesting a high homogeneity of children's age in districts. The repartition of ages' mean was less homogenous in women compared to children. Indeed significant differences of the ages' mean can exist between women of two districts for which pair confidence intervals of ages' means overlapped (for example between Darou Salam 2 and Yoff Dagoudane; Darou salam 2 and Maka Colobane). The mean of women age in all districts was 36.4 years-old.

IgG response median levels and the intensity of exposure to *An. gambiae* bites

Medians of anti-gSG6-P1 individual IgG responses for all individuals (children and adult women , Figure 3A), children (Figure 3B) and women (Figure 3C) and the number of *An. gambiae* bites/Human/Night (BHN) were compared according to CDs.

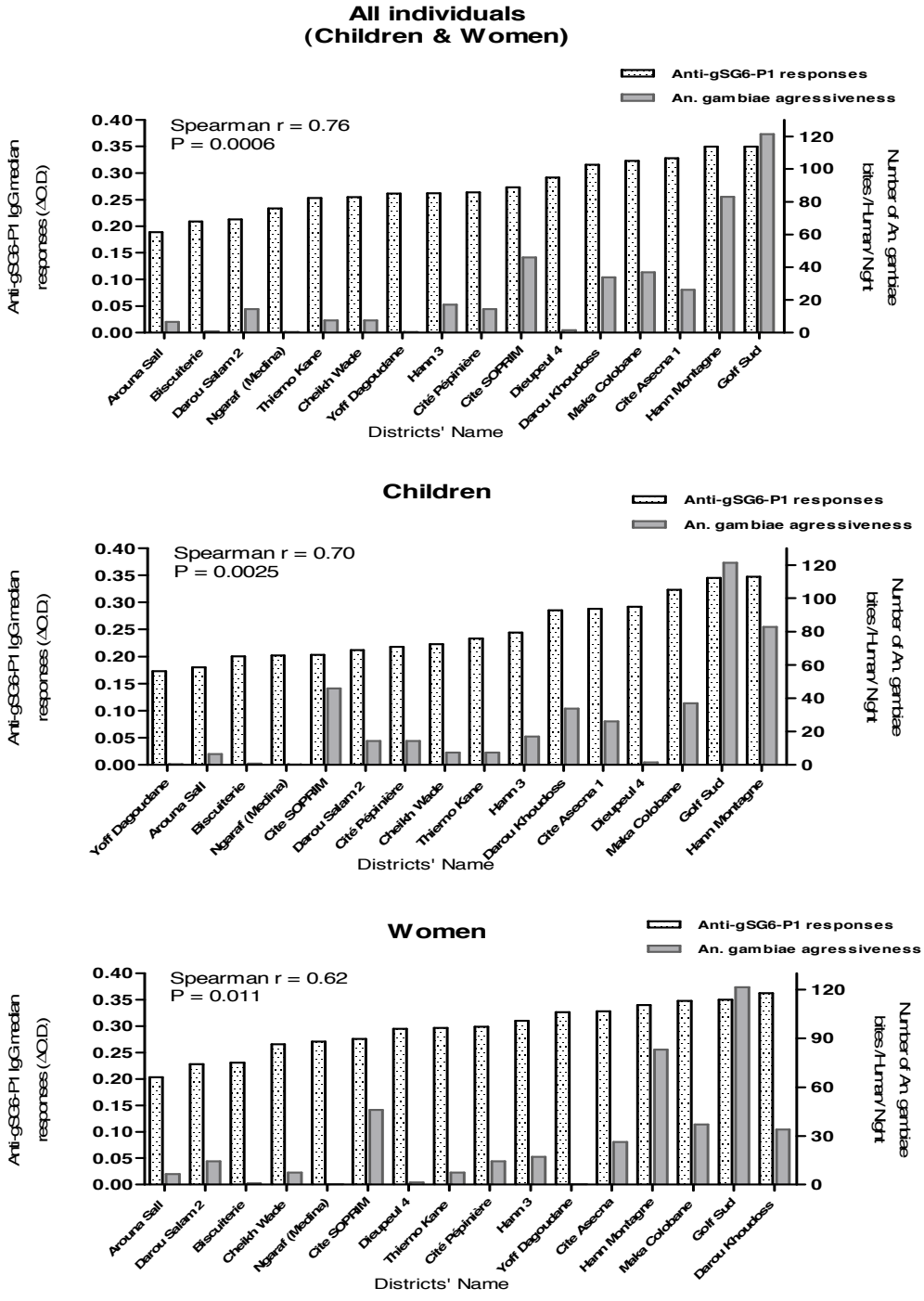


Figure 3: Anti-gSG6-P1 IgG response median levels and the intensity of exposure to *An. gambiae* bites in each site.

Medians of anti-gSG6-P1 individual IgG responses (white dotted box) and the number of *An. gambiae* bites/Human/Night (grey box) are presented for all individuals (children and adults, A), children (B) and women (C) according the districts. Statistical significant linear associations are indicated (non-parametric Spearman Correlation test).

Entomological data showed that intensities of exposure were globally low and varied according districts (0.3 to 121.4 BHN). Indeed, the number of *An. gambiae* BHN was lower in Ngaraf (0.3 bite/Human/Night), in Yoff Dagoudane (0.4 bite/Human/Night) and Biscuiterie (0.8 bite/Human/Night), where anti-gSG6-P1 IgG responders' percentages and median responses were also low (for all individuals, Table 2 and Figure 3a). In Dieupeul 4 (1.5 BHN), anti-gSG6-P1 IgG responders' percentages and median responses were medium. In Golf Sud (121.4 BHN), Hann Montagne (82.9 BHN), Maka Colobane (37.0 BHN) and Darou Khoudoss (33.7 BHN) anti-gSG6-P1 IgG responders' percentages and median responses were both high. It appears also that the ascending order of districts according their anti-gSG6-P1 IgG median response is not similar in the three cohorts ("all individuals", children or women only; Figure 3).

Linear simple correlation between IgG median responses and exposure levels to *An. gambiae* bites was evaluated by the non-parametric Spearman correlation test. A positive linear correlation was observed in comparing medians of IgG responses of districts and corresponding exposure levels to *An. gambiae s.l.* bites (Figure 3). This correlation was better in "all individuals" cohort (Spearman r= 0.76 with P= 0.0006) and in children (Spearman r= 0.70 with P= 0.0025) than in women (Spearman r= 0.62 with P= 0.011).

IgG response to gSG6-P1 peptide: a better tool than the intensity of Anopheles exposure level in evaluation of urban malaria risks?

The CDs have been classified in three "gSG6-P1 peptide IgG response-level" groups (group 1 = low exposed; group 2 = medium exposed; group 3 = high exposed districts) according to the percentage of IgG IR and the medians of IgG responses of "all individuals", as mentioned and explained in Table 3.

Table 3: Constitution of "anti-gSG6-P1 peptide IgG response-level" groups

Anti-gSG6-P1 IgG groups	Districts' name	% anti-gSG6-P1 responders	Rank 1	Anti-gSG6-P1 IgG median responses	Rank 2	Rank sum	An. gambiae Bites /Human/Nigh
Group 1	Arouna Sall	43.55	1	0.189	1	2	6.6
	Biscuiterie	50.00	3	0.209	2	5	0.3
	Ngaraf (Médina)	50.00	2	0.234	4	6	0.8
	Darou Salam 2	54.29	4	0.214	3	7	14.3
Group 2	Yoff Dagoudane	54.84	5	0.262	7	12	0.4
	Thierno Kane	61.43	7	0.254	5	12	7.4
	Cité Pépinière	59.68	6	0.264	9	15	14.3
	Hann 3	64.06	9	0.263	8	17	17.1
	Cheikh Wade	70.00	11	0.255	6	17	7.4
	Dieupeul 4	62.07	8	0.292	11	19	1.5
	Cite SOPRIM	65.52	10	0.274	10	20	46.0
Group 3	Cite Asecna 1	74.29	12	0.328	14	26	26.2
	Darou Khoudoss	82.76	14	0.316	12	26	33.9
	Golf Sud	81.25	13	0.350	15	28	121.4
	Maka Colobane	83.33	15	0.323	13	28	37.0
	Hann Montagne	86.84	16	0.350	15	31	82.9

Districts are classed in an ascending order according their proportion of anti-gSG6-P1 IgG responders (Rank 1 column) and median response (Rank 2 column). A rank number was assigned to each district according its position in the considering rank column. The sum of the two rank numbers of each district was realized and final districts' ascending classification was performed according the Rank sum. Thus, three "anti-gSG6-P1 peptide IgG" emerge.

The anti-gSG6-P1 peptide IgG responders' percentage, the median response and the intensity of exposure level to *An. gambiae* bites (BHN) were compared between these three groups using a simple ANOVA test (Figure 4). More significant differences between means of groups were obtained with % of IgG IR ($P< 0.0001$) and medians of IgG responses ($P< 0.0001$) than with intensities of exposure levels to *An. gambiae* bites ($P= 0.009$). Results reported that means of percentages of IgG IR, IgG median responses and intensities of exposure levels to *An. gambiae* bites were at least different between two groups. Moreover, all pairs of groups have shown high significant differences ($P< 0.0001$; Bonferroni's Multiple Comparison Test) in means of IgG responders' percentages and IgG median responses. In contrast, for the intensity of exposure levels to bites (Figure 4c), only group "high exposed" versus group "low exposed" and group "high exposed" versus group "medium exposed" showed significant differences ($P< 0.01$); no significant difference was noted between group "medium exposed" and group "low exposed".

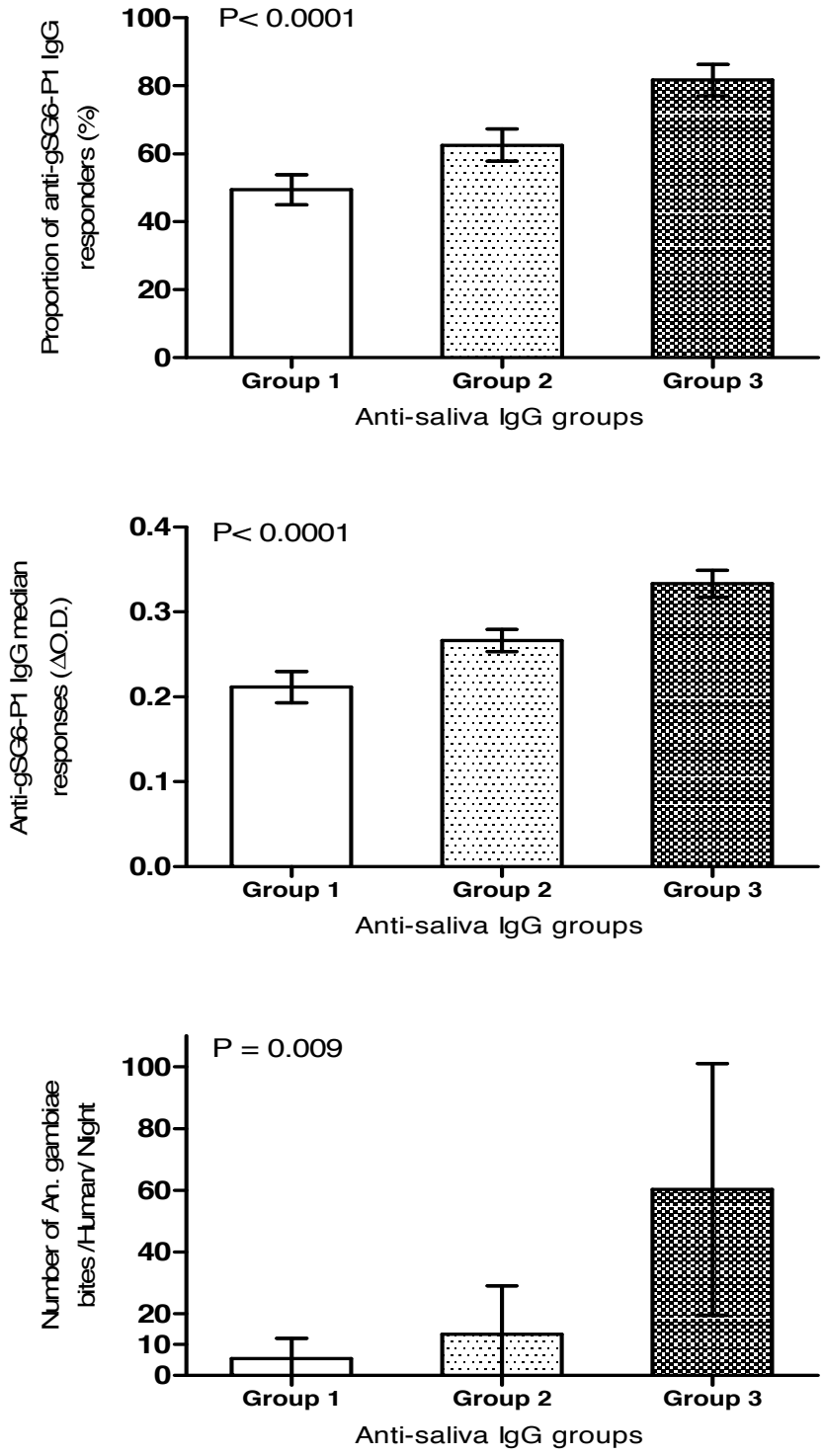


Figure 4: Comparison of proportions of anti-gSG6-P1 IgG responders, medians of anti-gSG6-P1 IgG responses and the intensity of exposure to *An. gambiae* bites between "anti-gSG6-P1 IgG" groups.

Statistical significant difference between the three groups is indicated using an ANOVA simple test and differences between each pair of groups by the Bonferroni's Multiple Comparison Test.

Discussion

This present study reports a considerable heterogeneity in individual and community exposure to *An. gambiae s.l.* bites, and therefore in the malaria transmission risks in 16 districts of downtown Dakar and its suburbs.

The Ab responses specific to *Anopheles gambiae* gSG6-P1 synthetic salivary peptide have been previously reported to be a biomarker of the low exposure level to *An. gambiae* bites in children living in a rural malaria endemic area of Senegal [35]. The present study aimed to evaluate the use of this gSG6-P1 biomarker in measuring the heterogeneity of malaria risks in people living in an endemic urban area.

In this study, we have shown that exposed individuals (children and adult women) developed an IgG response to the gSG6-P1 peptide, with considerable variations among/between children, women and studied district areas of Dakar region, an urban malaria area. These results suggest IgG Ab response to gSG6-P1 was specific to individual, community, as it had been shown recently (Drame *et al*., In press), and district area.

The general positive well-correlation between entomological data and anti-gSG6-P1 IgG Ab levels in children, women and "all population" (children and women) according to districts suggest that differences of exposure levels to bites can explain mainly specific anti-gSG6-P1 IgG Ab variations among and between groups and areas, confirming previous results observed in rural area of Senegal in children exposed to *An. gambiae* bites[28, 35]. Indeed, as shown by entomological results, *An. gambiae s.l.* densities and aggressiveness varied within district areas, due to local differences of larval breeding sites, which can be advantaged or disadvantaged by environmental modifications (urban agriculture, irrigations…) [14, 38, 39]. Human-vector contact can be also advantaged or disadvantaged by population density [40] and the hauteur of their habitat (down or up floors). However, the correlation between the IgG median response to gSG-6-P1 and the exposure level to *An. gambiae* bites was relatively very weak in some CDs. In Arouna Sall for example, a district with a higher rate of *An. gambiae* aggressiveness, IgG specific median response was lower compared to other CDs with similar (Thierno Kane and Cheikh Wade) or lower (Ngaraf, Biscuiterie, Yoff-Dagoudane and Dieupeul 4) *An. gambiae* aggressiveness rate. Moreover, a simple linear regression test shows that *An. gambiae* aggressiveness rates explained only 52% of the individuals' specific IgG responses. These observations suggest that other factors/elements (factors other than *An. gambiae* aggressiveness rate) may contribute to explain the individuals IgG responses to

gSG6-P1 peptide. For example the use of tools which can reduce drastically human-vector contact (ITNs use, curtains…) and then IgG specific responses.

Another factor which can explain a part of these results is age variations which had been shown to influence IgG Ab response especially in children, even if this kind of Ab immunity does not appear to be accumulative with exposure during individual life but waning rapidly even with sustained exposure [28, 35]. Indeed in regard to the general immune response to specific antigens, IgG Ab response is known to be acquired progressively with age. But in this study, the repartition of ages' means according district areas is similar in children and almost similar in women and thus could not be a factor of confusion of the anti-gSG6-P1 IgG Ab response.

Except for Cite SOPRIM (percentage of anti-gSG6-P1 IgG Ab responders significantly higher in women), significant differences of percentages of anti-gSG6-P1 IgG Ab responders and medians of specific IgG Ab responses to gSG6-P1 peptide were not observed between children and women living in the same district area, even if the global tendency (in all districts) was a higher IgG responses and responders in women.

This result appears to be surprising in regard to the fact that children and women do not have the same behaviour and status in relation to the exposure level to bites, even if they live within the same household. In addition the fact that the ascending order of districts according their anti-gSG6-P1 IgG median response is not similar in the three cohorts ("all individuals", children or women only) confirms the heterogeneity of exposure levels between children et women (adults) living in the same district area.

It will be therefore interesting to investigate the level of individual "sensation of bites" (perception) and the use of malaria vector control methods (ITNs and others) which are generally well- widespread in urban endemic malaria areas [41].

In all cases, the fairly high percentages of anti-gSG6-P1 IgG Ab responders observed in all district areas suggest that exposure levels to bites and therefore malaria transmission risks are relatively considerable in Dakar and its suburbs, even if malaria prevalence was reported to be low in these areas [11, 16]. These results, covering both children and adults (women), suggest that this immunological marker could also be used to evaluate *Anopheles* exposure in adults and children living in urban South-Saharan Africa areas where exposure level to malaria vectors and malaria transmission are known to be relatively low and very heterogeneous [9] and complete then previous results [35]. In these particular urban settings, it appeared also interesting that this biomarker could be used to evaluate the heterogeneity of individual and

community exposure levels to bites and use of malaria vector control tools and therefore the individual malaria risks.

Interestingly, means anti-gSG6-P1 IgG responders' percentages and median anti-gSG6-P1 IgG responses were highly significantly different between all pairs of "IgG" groups while means of intensity of exposure levels to *An. gambiae* bites were significantly different only between the high "IgG" group (group 3) and the other "IgG" groups (group 2, medium "IgG" group and group 1, low "IgG" group). These results suggest that IgG Ab response to gSG6-P1 evaluated better the heterogeneity of community exposure levels to malaria vectors bites between district areas in urban malaria region than current entomological methods. This observation indicate the useful of such biomarker in the evaluation of exposure levels to bites in these particular low/very low exposure contexts, where current entomological methods can give an inadequate or unreal measure of exposure levels because of their limited sensitivity [35]. However, it must be interpreted with detachment. Indeed mosquitoes catch sites were sometimes distanced from more than 250-300 m to the epicentre of human blood sampling site and might be not evaluate really *An. gambiae* aggressiveness in concerning district areas. Nevertheless the global low number of *Anopheles* mosquitoes collected suggests a probable underestimation of *An. gambiae* aggressiveness and thus the reliability to evaluate urban exposure levels by current entomological tools. Moreover, it has been recently observed, in people living in low malaria endemic area in Angola, that the variations of individual anti-whole saliva IgG responses and of *Plasmodium falciparum* densities were well associated after bed-nets use in contrary to entomological data [30]. Therefore, it will be interesting to have parasitological data from these sites in order to be more conclusive.

A precise and reliable evaluation of exposure levels to malaria vectors bites can be therefore assess by the approach of IgG response to gSG6-P1. Another major interest of this approach is the entire specificity to *Anopheles* bites. Indeed, the use of this peptide counteracts the possible cross-reactivity with shared epitopes on immunogenic salivary proteins from other arthropods, as previously described [34]. This specificity and sensitivity to the gSG6-P1 biomarker appeared to be especially efficient in a context of low *Anopheles* exposure, and then in urban settings.

Conclusions:

To identify new biomarkers for malaria transmission risks, an efficient and adapted tool is being sought to evaluate exposure level to vectors' bites. An approach based on measuring IgG Ab responses to specific gSG6-P1 *Anopheles* synthetic peptide represents a new way to evaluating the heterogeneity of exposure level to bites and malaria transmission risks at population and at individual, notably, levels, in urban endemic malaria areas. This individual approach is complementary to entomological methods because contributes information about real human contact with anthropophilic *Anopheles* in these low exposure areas.

The development of such biomarker would be particularly relevant in mapping malaria risk in urban settings where exposure level is low in general, but also in high-altitude or seasonal malaria, and in travellers in endemic areas could represent an alternative way to obtain new criteria for measuring the efficacy of vector control strategies (ITN use, household spraying, curtains, etc.) in phase 3 trials and the monitoring of strategies by National Malaria Control Programs.

References

1. Guerra CA, Gikandi PW, Tatem AJ, Noor AM, Smith DL, Hay SI, Snow RW, 2008. The limits and intensity of Plasmodium falciparum transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. PLoS Med 5: e38.
2. Baudon D, Louis FJ, Martet G, 1996. [In Africa, urban malaria is the malaria of tomorrow]. Med Trop (Mars) 56: 323-5.
3. Wang SJ, Lengeler C, Smith TA, Vounatsou P, Cisse G, Diallo DA, Akogbeto M, Mtasiwa D, Teklehaimanot A, Tanner M, 2005. Rapid urban malaria appraisal (RUMA) in sub-Saharan Africa. Malar J 4: 40.
4. Hay SI, Guerra CA, Tatem AJ, Atkinson PM, Snow RW, 2005. Urbanization, malaria transmission and disease burden in Africa. Nat Rev Microbiol 3: 81-90.
5. Keiser J, Utzinger J, Caldas de Castro M, Smith TA, Tanner M, Singer BH, 2004. Urbanization in sub-saharan Africa and implication for malaria control. Am J Trop Med Hyg 71: 118-27.
6. Knudsen AB, Slooff R, 1992. Vector-borne disease problems in rapid urbanization: new approaches to vector control. Bull World Health Organ 70: 1-6.
7. Martens P, Hall L, 2000. Malaria on the move: human population movement and malaria transmission. Emerg Infect Dis 6: 103-9.
8. Chinery WA, 1984. Effects of ecological changes on the malaria vectors Anopheles funestus and the Anopheles gambiae complex of mosquitoes in Accra, Ghana. J Trop Med Hyg 87: 75-81.
9. Robert V, Macintyre K, Keating J, Trape JF, Duchemin JB, Warren M, Beier JC, 2003. Malaria transmission in urban sub-Saharan Africa. Am J Trop Med Hyg 68: 169-76.

10. Donnelly MJ, McCall PJ, Lengeler C, Bates I, D'Alessandro U, Barnish G, Konradsen F, Klinkenberg E, Townson H, Trape JF, Hastings IM, Mutero C, 2005. Malaria and urbanization in sub-Saharan Africa. Malar J 4: 12.
11. Diallo S, Konate L, Ndir O, Dieng T, Dieng Y, Bah IB, Faye O, Gaye O, 2000. [Malaria in the central health district of Dakar (Senegal). Entomological, parasitological and clinical data]. Sante 10: 221-9.
12. Pages F, Texier G, Pradines B, Gadiaga L, Machault V, Jarjaval F, Penhoat K, Berger F, Trape JF, Rogier C, Sokhna C, 2008. Malaria transmission in Dakar: a two-year survey. Malar J 7: 178.
13. Trape JF, Lefebvre-Zante E, Legros F, Ndiaye G, Bouganali H, Druilhe P, Salem G, 1992. Vector density gradients and the epidemiology of urban malaria in Dakar, Senegal. Am J Trop Med Hyg 47: 181-9.
14. Machault V, Gadiaga L, Vignolles C, Jarjaval F, Bouzid S, Sokhna C, Lacaux JP, Trape JF, Rogier C, Pages F, 2009. Highly focused anopheline breeding sites and malaria transmission in Dakar. Malar J 8: 138.
15. Machault V, Vignolles C, Pages F, Gadiaga L, Gaye A, Sokhna C, Trape JF, Lacaux JP, Rogier C, 2010. Spatial heterogeneity and temporal evolution of malaria transmission risk in Dakar, Senegal, according to remotely sensed environmental data. Malar J 9: 252.
16. Diallo S, Ndir O, Faye O, Diop BM, Dieng Y, Bah IB, Dieng T, Gaye O, Konate L, 1998. [Malaria in the southern sanitary district of Dakar (Senegal). 1. Parasitemia and malarial attacks]. Bull Soc Pathol Exot 91: 208-13.
17. Remoue F, Cornelie S, Ngom A, Boulanger D, Simondon F, 2005. Immune responses to arthropod bites during vector-borne diseases. In *Update in tropical immunology* Edited by: Garraud O. Fort P.O. Trivandrum, Herala, India: Transworld research Network: 377-400.
18. Schwartz BS, Ribeiro JM, Goldstein MD, 1990. Anti-tick antibodies: an epidemiologic tool in Lyme disease research. Am J Epidemiol 132: 58-66.
19. Champagne DE, 2004. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord 4: 375-96.
20. Ribeiro JM, 1995. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis 4: 143-52.
21. Brummer-Korvenkontio H, Palosuo K, Palosuo T, Brummer-Korvenkontio M, Leinikki P, Reunala T, 1997. Detection of mosquito saliva-specific IgE antibodies by capture ELISA. Allergy 52: 342-5.
22. Lane RS, Moss RB, Hsu YP, Wei T, Mesirow ML, Kuo MM, 1999. Anti-arthropod saliva antibodies among residents of a community at high risk for Lyme disease in California. Am J Trop Med Hyg 61: 850-9.
23. Barral A, Honda E, Caldas A, Costa J, Vinhas V, Rowton ED, Valenzuela JG, Charlab R, Barral-Netto M, Ribeiro JM, 2000. Human immune response to sand fly salivary gland antigens: a useful epidemiological marker? Am J Trop Med Hyg 62: 740-5.
24. Nascimento RJ, Santana JM, Lozzi SP, Araujo CN, Teixeira AR, 2001. Human IgG1 and IgG4: the main antibodies against Triatoma infestans (Hemiptera: Reduviidae) salivary gland proteins. Am J Trop Med Hyg 65: 219-26.
25. Poinsignon A, Remoue F, Rossignol M, Cornelie S, Courtin D, Grebaut P, Garcia A, Simondon F, 2008. Human IgG antibody response to Glossina saliva: an epidemiologic marker of exposure to Glossina bites. Am J Trop Med Hyg 78: 750-3.
26. Palosuo K, Brummer-Korvenkontio H, Mikkola J, Sahi T, Reunala T, 1997. Seasonal increase in human IgE and IgG4 antisaliva antibodies to Aedes mosquito bites. Int Arch Allergy Immunol 114: 367-72.

27. Remoue F, Alix E, Cornelie S, Sokhna C, Cisse B, Doucoure S, Mouchet F, Boulanger D, Simondon F, 2007. IgE and IgG4 antibody responses to Aedes saliva in African children. Acta Trop 104: 108-15.
28. Remoue F, Cisse B, Ba F, Sokhna C, Herve JP, Boulanger D, Simondon F, 2006. Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. Trans R Soc Trop Med Hyg 100: 363-70.
29. Waitayakul A, Somsri S, Sattabongkot J, Looareesuwan S, Cui L, Udomsangpetch R, 2006. Natural human humoral response to salivary gland proteins of Anopheles mosquitoes in Thailand. Acta Trop 98: 66-73.
30. Drame PM, Poinsignon A, Besnard A, Le Mire J, Dos-Santos MA, Sow CS, Cornelie S, Foumane V, Toto J-C, Sembene M, Boulanger D, Simondon S, Fortes F, Carnevale P, Remoue F, 2010. Human antibody response to *Anopheles gambiae* saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of Insecticide-Treated Nets in malaria vector control Am J Trop Med Hyg in press.
31. Lombardo F, Ronca R, Rizzo C, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Curra C, Fiorentino G, Bourgouin C, Ribeiro JM, Petrarca V, Ponzi M, Coluzzi M, Arca B, 2009. The Anopheles gambiae salivary protein gSG6: an anopheline-specific protein with a blood-feeding role. Insect Biochem Mol Biol 39: 457-66.
32. Valenzuela JG, Francischetti IM, Pham VM, Garfield MK, Ribeiro JM, 2003. Exploring the salivary gland transcriptome and proteome of the Anopheles stephensi mosquito. Insect Biochem Mol Biol 33: 717-32.
33. Orlandi-Pradines E, Almeras L, Denis de Senneville L, Barbe S, Remoue F, Villard C, Cornelie S, Penhoat K, Pascual A, Bourgouin C, Fontenille D, Bonnet J, Corre-Catelin N, Reiter P, Pages F, Laffite D, Boulanger D, Simondon F, Pradines B, Fusai T, Rogier C, 2007. Antibody response against saliva antigens of Anopheles gambiae and Aedes aegypti in travellers in tropical Africa. Microbes Infect 9: 1454-62.
34. Poinsignon A, Cornelie S, Mestres-Simon M, Lanfrancotti A, Rossignol M, Boulanger D, Cisse B, Sokhna C, Arca B, Simondon F, Remoue F, 2008. Novel peptide marker corresponding to salivary protein gSG6 potentially identifies exposure to Anopheles bites. PLoS One 3: e2472.
35. Poinsignon A, Cornelie S, Ba F, Boulanger D, Sow C, Rossignol M, Sokhna C, Cisse B, Simondon F, Remoue F, 2009. Human IgG response to a salivary peptide, gSG6-P1, as a new immuno-epidemiological tool for evaluating low-level exposure to Anopheles bites. Malar J 8: 198.
36. Gillies MT, Coetzee M, 1987. A supplement to the anophelinae of Africa south of the Sahara (Afrotropical region): The South African Institut for Medical Research No. 55 Johannesburg, South Africa.
37. Drame PM, Poinsignon A, Besnard P, Le Mire J, Dos-Santos MA, Sow CS, Cornelie S, Foumane V, Toto JC, Sembene M, Boulanger D, Simondon F, Fortes F, Carnevale P, Remoue F, Human antibody response to Anopheles gambiae saliva: an immuno-epidemiological biomarker to evaluate the efficacy of insecticide-treated nets in malaria vector control. Am J Trop Med Hyg 83: 115-21.
38. Matthys B, N'Goran EK, Kone M, Koudou BG, Vounatsou P, Cisse G, Tschannen AB, Tanner M, Utzinger J, 2006. Urban agricultural land use and characterization of mosquito larval habitats in a medium-sized town of Cote d'Ivoire. J Vector Ecol 31: 319-33.
39. Matthys B, Vounatsou P, Raso G, Tschannen AB, Becket EG, Gosoniu L, Cisse G, Tanner M, N'Goran E K, Utzinger J, 2006. Urban farming and malaria risk factors in a medium-sized town in Cote d'Ivoire. Am J Trop Med Hyg 75: 1223-31.

40. Dambach P, Sie A, Lacaux JP, Vignolles C, Machault V, Sauerborn R, 2009. Using high spatial resolution remote sensing for risk mapping of malaria occurrence in the Nouna district, Burkina Faso. Glob Health Action 2.
41. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, Khatib R, Al-Mafazy AW, Ramsan M, Rotllant G, Gerstenmaier JF, Molteni F, Abdulla S, Montgomery SM, Kaneko A, Bjorkman A, 2007. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. PLoS Med 4: e309.

Nom et prénoms du Candidat : DRAMÉ Papa Makhtar

Titre de la thèse :
Relation Homme-Vecteur au cours du paludisme : développement d'un nouvel outil immuno-épidémiologique évaluant l'efficacité de la lutte anti-vectorielle

Date et lieu de soutenance : 22 Décembre 2010 à 15 Heures à la Faculté de Médecine, de Pharmacie et d'Odonto-Stomatologie (**FMPOS**), UCAD, Dakar, Sénégal

Jury : Président : Pr. Niama Diop SALL, FMPOS, UCAD
Membres : Dr. Babacar FAYE, FMPOS, UCAD
Pr. Ousmane FAYE, FST, UCAD
Dr. Franck REMOUÉ, IRD, Cotonou (Bénin)
Dr. Mbacké SEMBÈNE, FST, UCAD
Pr. Bhen Sikina TOGUEBAYE, FST, UCAD

Résumé : La transmission de maladies par des vecteurs arthropodes représente un problème majeur de santé publique dans les pays du Sud. Parmi ces maladies, le paludisme est l'infection parasitaire la plus grave. Sa transmission est liée à l'exposition de l'homme au moustique *Anopheles*. Pour un meilleur contrôle de cette parasitose, plusieurs efforts sont déployés pour développer de nouveaux outils. Il a été récemment montré que l'évaluation, chez l'homme, de la réponse anticorps (Ac) dirigée contre les protéines salivaires d'*Anopheles* représentait un biomarqueur d'exposition aux piqûres de cet arthropode hématophage. Dans ce contexte, par une approche immuno-épidémiologique exploitant les propriétés immunogéniques des protéines salivaires des *Anopheles* vecteurs, ce travail avait pour objectif de valider des candidats « salivaires », biomarqueurs, comme un nouvel outil permettant d'évaluer l'efficacité de la lutte anti-vectorielle dans différents contextes épidémiologiques.

Tout d'abord, nous avons montré qu'il était possible, pertinent et fiable de doser, par la méthode ELISA, des anticorps IgG et IgM spécifiques aux protéines salivaires d'*Anopheles,* à partir de gouttes de sang total récolté sur papier buvard. Nous avons, ensuite, montré, chez des populations de l'Angola, que la réponse IgG spécifique à la salive totale d'*Anopheles gambiae* représente, en plus d'un biomarqueur d'exposition, un indicateur permettant d'évaluer l'effiacité individuelle de l'utilisation de la moustiquaire, quels que soient l'âge et le sexe, validant ainsi le concept « réponse anticorps anti-protéines salivaires = outil d'efficacité de la lutte antivectorielle ». Ces résultats ont été confirmés avec le peptide candidat biomarqueur gSG6-P1, spécifique aux moustiques du genre *Anopheles*. En effet, la réponse IgG anti-gSG6-P1 des enfants et adultes de l'Angola, avait fortement baissée après utilisation de moustiquaires imprégnées, comparativement à avant mise en place des moustiquaires. Ceci était observé à un niveau populationnel, mais aussi individuel. Une perte et une mauvaise utilisation de ces moustiquaires, 4 mois seulement après leur distribution, étaient accompagnées d'une augmentation des niveaux d'IgG anti-gSG6-P1. Dans l'objectif d'une optimisation de ce peptide biomarqueur, nous avons également montré que la réponse Ac anti-gSG6-P1 semble particulièrement adapter pour : (1) évaluer l'hétérogénéité de l'exposition des populations humaines et l'utilisation de diverses stratégies de LAV (moustiquaires, bombes aérosols, serpentins fumigènes, encens…) dans un contexte de paludisme urbain (Dakar, Sénégal), (2) détecter une forte exposition d'enfants (0-9 ans) aux piqûres d'*An. funestus* d'une zone rurale du Sénégal, montrant ainsi que ce peptide est également biomarqueur de ce second vecteur majeur de paludisme et 3) mesurer l'exposition aux *Anopheles* chez de très jeunes enfants (nouveau-nés à 1 an) dans une zone rurale du Sud du Bénin.

L'ensemble de ces travaux contribue à une meilleure connaissance des relations immunologiques homme-vecteur au cours du paludisme. L'obtention d'un tel biomarqueur immuno-épidémiologique s'avère particulièrement utile dans l'évaluation de l'efficacité des interventions de lutte anti-vectorielle et dans la surveillance des risques de transmission du paludisme, outil qui pourrait être intégré par les Programmes Nationaux de Lutte contre le Paludisme. Cette approche pourrait être développée pour d'autres maladies à transmission vectorielle émergentes ou ré-émergentes (arboviroses) ou négligées (leishmanioses, THA…) tant dans les pays du Sud que du Nord.

Mots clés : ***Anopheles*, immuno-épidémiologie, protéines/peptides salivaires, réponse anticorps, biomarqueur, outil d'efficacité, lutte anti-vectorielle, paludisme**